



HAL
open science

Impact de la composition lipidique de la membrane plasmique eucaryote sur l'adhésion bactérienne via l'interaction du flagelle bactérien : détermination des paramètres clés à l'échelle moléculaire

Hélène Cazzola

► **To cite this version:**

Hélène Cazzola. Impact de la composition lipidique de la membrane plasmique eucaryote sur l'adhésion bactérienne via l'interaction du flagelle bactérien : détermination des paramètres clés à l'échelle moléculaire. Bactériologie. Université de Technologie de Compiègne, 2019. Français. NNT : 2019COMP2533 . tel-03512856

HAL Id: tel-03512856

<https://theses.hal.science/tel-03512856>

Submitted on 5 Jan 2022

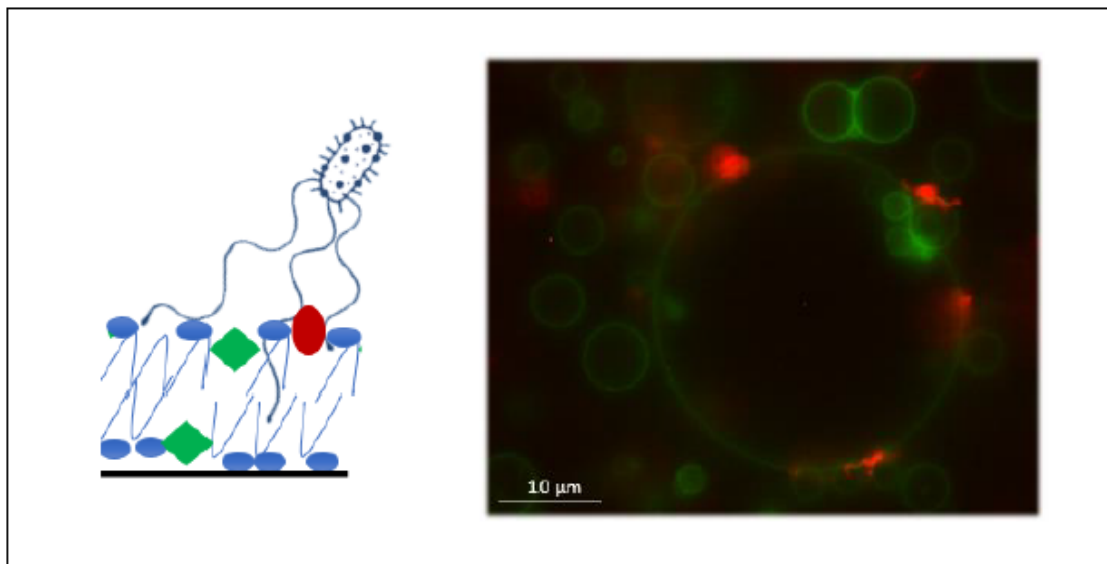
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Par **Hélène CAZZOLA**

Impact de la composition lipidique de la membrane plasmique eucaryote sur l'adhésion bactérienne via l'interaction du flagelle bactérien : détermination des paramètres clés à l'échelle moléculaire

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 3 décembre 2019

Spécialité : Biotechnologie : Unité de recherche Génie
Enzymatique et Cellulaire - GEC (UMR-7025)

D2533



Université de Technologie de Compiègne

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Ingénieur (ED 71)

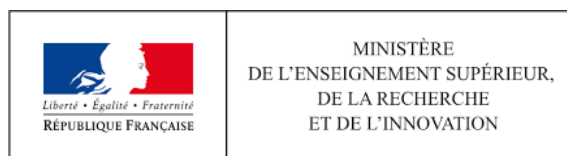
Spécialité : Biotechnologie

Par Hélène CAZZOLA

Impact de la composition lipidique de la membrane plasmique eucaryote sur
l'adhésion bactérienne *via* l'interaction du flagelle bactérien.
Détermination des paramètres clés à l'échelle moléculaire.

Soutenue le 3 décembre 2019 devant le jury composé de :

- **M. Daniel LADANT**, Rapporteur
Directeur de Recherche, Université Sorbonne Paris Cité, Institut Pasteur
- **M. Jean-Philippe MICHEL**, Rapporteur
Maître de Conférences HDR, Université Paris Sud, CNRS
- **Mme Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT**, Examinatrice
Directrice de Recherche, Université de Tours, INRA Centre Val de Loire
- **Mme Yolande PERRIN**, Examinatrice
Professeure des Universités, Université de Technologie de Compiègne, CNRS
- **M. Yannick ROSSEZ**, Directeur de thèse
Chargé de Recherche, Université de Technologie de Compiègne, CNRS
- **Mme Claire ROSSI**, Directrice de thèse
Professeure des Universités, Université de Technologie de Compiègne, CNRS



Ce travail a été supervisé par Dr. Yannick ROSSEZ et Pr. Claire ROSSI, au sein du Génie Enzymatique et Cellulaire - UMR CNRS 7025. Il a bénéficié d'un financement par allocation ministérielle.



Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer toute ma gratitude à mes deux directeurs de thèse, M. Yannick ROSSEZ et Mme Claire ROSSI, pour leur encadrement, leurs conseils, leur gentillesse, leur disponibilité, et leur soutien moral et matériel.

Merci Claire d'avoir cru en moi. Depuis cette rencontre lors de mon stage de master 2, tu ne m'as pas quittée et tu m'as permis d'aller encore plus loin en me présentant ce superbe sujet. Merci pour tes conseils et ton expérience.

Merci Yannick de m'avoir accordée ta confiance pour ton premier projet de thèse, « ton bébé », surtout à quelqu'un n'ayant jamais fait auparavant de microbiologie. Aujourd'hui on peut dire que cette époque est révolue ! Merci pour ton enthousiasme, ton humour, les nombreux échanges scientifiques, mais aussi pour tout ce que tu m'as appris chaque jour.

Je souhaite également remercier M. Daniel LADANT et M. Jean-Philippe MICHEL d'avoir accepté de rapporter ma thèse et pour leur contribution à ce travail.

Merci également à Mme Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT et Mme Yolande PERRIN d'avoir consenti à faire partie de mon jury de thèse et pour l'examen de ce travail.

Un grand merci à toutes les personnes qui se sont investies dans ce projet : Adrian, Sébastien, Elise, Luminita, Caroline.

Laurine, j'ai été ravie de t'accueillir et de te former lors de tes premiers mois de thèse. Je tiens particulièrement à te remercier pour ta disponibilité et les manips supplémentaires que tu as réalisées pour ce travail.

Merci à tous les stagiaires : Maxime B., Oriane, Clément, Pauline et Henri qui ont vraiment pris à cœur ce sujet en contribuant aux résultats obtenus, et avec qui j'ai eu plaisir à partager mon travail.

Une pensée particulière pour Maxime S., qui a travaillé sur des études préliminaires à cette thèse, notamment les expériences en SPR.

Merci également aux collaborateurs pour cette relation de confiance.

Ces trois années au sein du laboratoire GEC resteront pour toujours gravées dans ma mémoire, bien sûr pour ce travail, mais aussi pour les belles rencontres et bons moments passés ensemble.

Merci à tous les membres du GEC de m'avoir accueillie durant ces années. Je souhaite remercier particulièrement les Valéries, Morgane et Carol pour leur gentillesse et services.

Merci également à l'équipe pédagogique de CM13 de m'avoir donné l'opportunité d'encadrer des TPs et pour leurs conseils et bienveillance. Je tiens à dire que mon premier TP restera dans les annales !

Merci aux autres doctorants et post-docs, notamment Nesrine, Laurine et Aurélien, pour l'entraide et la bonne ambiance au sein du labo. Je vous souhaite à tous le meilleur pour le reste de vos travaux.

Nesrine et Laurine, mes copines de bureau, j'ai partagé avec vous autant les moments de doute, que les résultats qui donnent le sourire, sans oublier les sorties entre amies. Vous allez me manquer !

Pour finir, je souhaite remercier ma famille, en particulier mes parents et ma sœur, merci pour votre soutien inconditionnel. Maximilien, merci pour ta présence quotidienne (n'oublie pas pour le meilleur et pour le pire !).

Résumé

Les entérobactéries pathogènes sont responsables d'épidémies majeures souvent d'origine alimentaire. Parmi elles, *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) O157:H7 est connue pour conduire à de graves symptômes, tels que le syndrome hémolytique et urémique (HUS). L'adhésion sur un tissu, qui est la première étape initiant la colonisation, est orchestrée par des organites et protéines situés sur la paroi cellulaire bactérienne, en particulier le flagelle.

Ce travail a pour objectif d'étudier l'interaction du flagelle bactérien avec les lipides de la membrane dans un système biologiquement pertinent, à savoir les liposomes unilamellaires géants (GUV, pour *Giant Unilamellar Vesicles*). Les GUVs sont largement utilisées en tant que modèle membranaire, car elles possèdent une taille et une courbure similaire à la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Une meilleure adhésion bactérienne en présence du flagelle a été confirmée sur GUVs par microscopie, puis de manière précise par un essai développé dans le cadre de ce travail, permettant de quantifier l'adhésion bactérienne sur liposomes. En faisant varier la nature des têtes polaires, des chaînes carbonées et la courbure des liposomes, l'ordre lipidique s'est avéré être un paramètre clé de l'adhésion. Ceci a été vérifié à l'échelle cellulaire par l'incorporation de lipides polyinsaturés dans la membrane de cellules HT29, sur lesquelles la souche sauvage O157:H7 adhère significativement plus que son mutant non-flagellé. L'hydrophobicité du flagelle a été identifiée comme un facteur important pour l'interaction avec la membrane, grâce à une modification post-traductionnelle (méthylation) de la flagelline, composante majeure du flagelle. De concert avec l'ordre lipidique, la fluidité membranaire entraîne une adhésion bactérienne hétérogène sur notre modèle mimant la ségrégation de phases, qui existe potentiellement sur la membrane plasmique. Il en résulte que le flagelle est un avantage pour conquérir les potentiels radeaux lipidiques.

A l'issue de ce travail, un premier mécanisme d'adhésion du flagelle bactérien sur la bicouche lipidique a été proposé et met en évidence les paramètres clés, mais aussi de nouvelles interrogations, notamment l'existence d'une interaction avec le cytosquelette. Une connaissance précise de ce mécanisme représente une étape vers la compréhension de la virulence des pathogènes, qui est indispensable pour développer des solutions alternatives aux antibiotiques.

MOTS-CLES : Flagelle, *Escherichia coli* entérohémorragique, Bicouche lipidique, Liposome géant unilamellaire, Ordre lipidique, Fluidité membranaire, Lipide polyinsaturé, Hydrophobicité

Abstract

Animal pathogenic enterobacteria are major source of foodborne outbreaks. Among them, Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is known to lead to severe diseases like Haemolytic Uremic Syndrome (HUS). The adhesion on tissues, which is the first step initiating the colonisation, is mediated by cell surface proteins and organelles, including flagellum.

This present work aims to study the interaction between the bacterial flagellum with lipid membrane into a relevant biological model, the Giant Unilamellar Vesicles (GUVs). GUVs are widely used as a membrane model, because of their similar size and curvature to the cell plasma membrane. A bacterial adhesion enhanced in the presence of flagella was confirmed on GUVs by microscopy, and precisely, by a newly developed assay for this work, allowing bacterial adhesion quantification on liposomes. By testing different head groups, the nature of the fatty acid chains or the liposome curvature, the lipid packing was found to be a key parameter for the adhesion. To test this, the incorporation of polyunsaturated lipids on HT29 cell line was used. The WT strain of EHEC O157:H7 was significantly more adherent than its non-flagellated mutant. The hydrophobicity was identified to influence the flagellum interaction with the lipid bilayer, by using a post-traductionnal modification (methylation) of the flagellin, the flagellum main component. With lipid packing, membrane fluidity leads to a heterogeneous bacterial adhesion on our models, mimicking the phase segregation, potentially existing on plasma membrane. It results that the flagellum is advantageous to reach potential lipid rafts.

At the end of this work, a first mechanism of bacterial flagellum adhesion on lipid bilayer has been proposed and highlights the key parameters, but as well new questionings, especially the existence of an interaction with the cytoskeleton. A future precise knowledge of this mechanism represents a step toward understanding pathogen virulence, which is mandatory to develop alternative solutions to antibiotics.

KEY-WORDS: Flagellum, Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Lipid bilayer, Giant Unilamellar vesicle, Lipid packing, Membrane fluidity, Polyunsaturated lipid, Hydrophobicity

Publications et communications

associées à cette thèse

Publications :

Rossi C., **Cazzola H.**, Holden N.J., Rossez Y. (2019) *Bacterial Adherence to Plant and Animal Surfaces Via Adhesin-Lipid Interactions*. In: Goldfine H. (eds) *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham (Disponible en section *Publications scientifiques issues de cette thèse*)

Cazzola, H., Lemaire, L., Acket, S., Prost, E., Duma-Catoire, L., Trouillas, P., Rossi, C., Rossez, Y. *Bacterial flagella attachment on plasma membrane and impact of lipid composition*. Article en préparation.

Horstmann, J. A., Lunelli, M., **Cazzola, H.**, Heidemann, J., Kühne, C., Steffen, P., Szefs, S., Rossi, C., Lokareddy, R. K., Wang, C., Hughes, K. T., Uetrecht, C., Schlüter, H., Grassl, G. A., H., Stradal, T., Rossez, Y., Kolbe, M., Erhardt, M. *Flagellin methylation promotes adhesion of Salmonella to hydrophobic host cell surfaces*. (2019) Article en révision dans *Nature Communication*. (Disponible en section *Publications scientifiques issues de cette thèse*)

Posters :

Cazzola Hélène, Morel Oriane, Lefebvre Caroline, Rossi Claire, Rossez Yannick. *Study of enterohaemorrhagic Escherichia coli flagellum adhesion on plant tissue*. 13^e Congrès national de la Société Française de Microbiologie, Octobre 2017, Paris, France.

Cazzola Hélène, Lemaire Laurine, Lefebvre Caroline, Rossi Claire, Rossez Yannick. *Determination at the molecular level of the key properties controlling bacterial flagellum interaction with plasma membrane lipids*. DGF Symposium « Membrane Lipids », Mai 2019, Berlin, Allemagne.

Cazzola Hélène, Lemaire Laurine, Lefebvre Caroline, Rossi Claire, Rossez Yannick. *Determination at the molecular level of the key properties controlling bacterial flagellum interaction with plasma membrane lipids*. 12th European Biophysics Congress « Biophysics for Life and Technology », Juillet 2019, Madrid, Espagne.

Communications orales :

Cazzola Hélène. *Compréhension de l'interaction flagelle/membrane : vers la fin d'un atout stratégique dans l'infection bactérienne*. Concours « Ma thèse en 180 secondes » - Finale régionale Sorbonne Université, 21 Mars 2018, Paris, France.

Cazzola Hélène, Lemaire Laurine, Lefebvre Caroline, Rossi Claire, Rossez Yannick. *Determination at the molecular level of the key properties controlling bacterial flagellum interaction with plasma membrane lipids*. GERLI 15th International Lipidomics Meeting « Biodiversity of lipid species – benefit for nutrition and effects on health », Septembre 2019, Compiègne, France.

Table des matières

Liste des Abréviations.....	xiii
Liste des Figures	xvii
Liste des Tableaux	xx
Introduction	1
Synthèse Bibliographique	4
I. La membrane plasmique.....	5
1. La nature lipidique de la membrane plasmique.....	5
1.1. Une bicouche lipidique	5
1.2. La diversité lipidique	6
1.2.1. Glycérophospholipides	6
1.2.2. Sphingolipides	7
1.2.3. Stérols.....	8
2. Le modèle de la mosaïque fluide.....	9
2.1. Une mosaïque de composants	10
2.2. Fluidité membranaire	10
3. Hétérogénéité des caractéristiques de la membrane	11
3.1. Asymétrie transmembranaire	11
3.2. Polymorphisme membranaire.....	13
4. Partition de la membrane	15
4.1. Existence des clusters lipidiques ?.....	15
4.2. Relation entre nano-domaines et bactéries.....	16
4.3. Régulation des domaines	17
4.4. Sous la membrane, le cytosquelette.....	18
II. Les vésicules géantes unilamellaires	19
1. Les méthodes d'obtention des GUVs.....	20
1.1. Hydratation douce	21
1.2. Electroformation.....	22
1.3. Hydratation assistée par gel.....	24
1.4. Méthodes à base d'émulsion et leur développement en systèmes microfluidiques	26
2. Application des GUVs pour étudier la membrane plasmique.....	31
2.1. Modèle membranaire biomimétique incontournable.....	31
2.2. Châssis cellulaire commun pour la biologie de synthèse.....	33
III. L'adhésion bactérienne, un processus clé de la virulence des pathogènes	34

1.	Les adhésines.....	35
1.1.	Pili « chaperone-usheer »	35
1.2.	Pili type IV (T4P).....	37
1.3.	Pili assemblés par sortase	38
1.4.	Fibres amyloïdes et curli	39
1.5.	Protéines de la membrane externe	40
1.6.	Flagelle	42
2.	Processus de l'adhésion bactérienne	44
3.	Les solutions anti-adhésion, une alternative aux antibiotiques ?	46
IV.	Le flagelle, une structure supramoléculaire auto-assemblée.....	48
1.	La machinerie cellulaire	49
1.1.	L'anneau Membrane-Supramembrane, la base du flagelle	49
1.2.	Système de sécrétion de type III, le cœur du flagelle	49
1.2.1.	PMF et complexe ATPase, deux rôles complémentaires	50
1.2.2.	L'appareil d'export, un antiport proton-protéine.....	51
1.2.3.	Transport des unités du cytoplasme vers l'appareil d'export	52
1.3.	Le moteur bidirectionnel.....	54
1.3.1.	Formation de l'anneau C.....	55
1.3.2.	Le complexe <i>switch</i>	56
1.3.3.	Dynamique de l'anneau C	57
1.3.4.	Les stators	57
2.	Structure axiale du flagelle : de la tige à la coiffe du filament	59
2.1.	Caractéristiques générales	59
2.1.1.	Tige	59
2.1.2.	Coude.....	60
2.1.3.	Jonction Tige-Coude	62
2.1.4.	Passage des unités associées au coude vers celles du filament	63
2.1.5.	Jonction Coude-Filament	64
2.1.6.	Filament	64
2.1.7.	Coiffe du filament.....	67
3.	Assemblage et variabilité du flagelle sous contrôle des gènes	68
3.1.	Assemblage coordonné et sa régulation.....	68
3.2.	La flagelline dans tous ses états	70
	Matériels et Méthodes	72
I.	Liposomes.....	73
1.	Matériels et précautions.....	73
2.	Formation des GUVs	73
3.	Formation des autres liposomes	74

4.	Mesure de la taille et du potentiel zêta	75
II.	Bactéries	76
1.	Souches bactériennes utilisées.....	76
2.	Culture et motilité	77
3.	Flagelle et flagelline	77
3.1.	Extraction de flagelles	77
3.2.	Obtention de la flagelline	78
3.3.	Purification et concentration des échantillons de flagelle ou flagelline	78
3.4.	Vérification de la pureté par électrophorèse SDS-PAGE.....	78
3.5.	Dosage protéique par BCA	79
III.	Microscopie à épifluorescence	80
1.	Marquage et immobilisation des liposomes	80
2.	Marquage des flagelles	82
IV.	Mesure de l'adhésion bactérienne sur liposomes	82
V.	Techniques basées sur la fluorescence	83
1.	Polarisation généralisée du Laurdan	83
2.	Mesure de l'hydrophobicité grâce à la sonde Prodan	84
3.	Anisotropie	84
4.	Relargage de carboxyfluorescéine.....	85
VI.	Méthodes de quantification lipidique	85
1.	Dosage de Stewart.....	85
2.	LC-MS	86
2.1.	Extraction lipidique	86
2.2.	Analyse LC-HRMS ²	87
2.3.	Traitement des données et annotation	88
3.	GC-FID	89
3.1.	Transméthylation et libération des acides gras.....	89
3.2.	Détermination de la quantité d'acides gras	89
4.	RMN ¹ H.....	89
VII.	Simulation moléculaire dynamique et corrélation.....	90
VIII.	Quantification de l'adhésion bactérienne <i>in vitro</i>	91
1.	Culture cellulaire HT29.....	91
2.	Incorporation des acides gras et adhésion bactérienne	91
IX.	Résonance Plasmonique de Surface	91
1.	Liaison avec une bicouche lipidique	91
2.	Liaison avec la G-actine.....	94

Résultats et Discussion	96
I. Avant-propos	97
II. Adhésion du flagelle bactérien sur les phospholipides de la membrane	98
1. Choix du modèle biomimétique et de son moyen d'obtention	98
2. Visualisation de l'interaction entre bactéries et GUVs	101
3. Quantification de l'adhésion bactérienne sur liposomes	104
3.1. Corrélation entre lipide et adhésion bactérienne	106
3.2. Les bactéries flagellées adhèrent davantage que les non-flagellées.....	107
4. Conclusion et sous-discussion	109
III. L'agencement de la bicouche, paramètre clé de l'adhésion bactérienne <i>via</i> le flagelle	110
1. Versatilité du test d'adhésion sur liposomes face à des compositions lipidiques diverses..	110
2. Les têtes polaires, premiers contacts du flagelle avec la bicouche lipidique.....	113
3. Les chaînes carbonées, un rôle sous-jacent dans l'interaction	116
4. Conclusion et sous-discussion	119
IV. Le flagelle en lien avec le cœur de la bicouche lipidique.....	121
1. Interaction du flagelle avec les chaînes hydrophobes de la membrane	121
1.1. Modification de l'ordre lipidique par le flagelle	121
1.2. L'hydrophobicité module l'adhésion bactérienne.....	124
2. Hétérogénéité de l'adhésion du flagelle en fonction de l'état physique de la membrane ..	126
2.1. L'adhésion bactérienne est sensible à la fluidité de la membrane	126
2.2. Le flagelle, un atout potentiel dans l'adhésion sur les domaines lipidiques ordonnés	129
3. Conclusion et sous-discussion	132
V. L'adhésion du flagelle sur la cellule, étape par étape	133
1. Importance relative des facteurs impliqués dans le processus adhésion sur la membrane	133
2. Au-delà de la bicouche lipidique ?.....	136
3. Conclusion et sous discussion	139
VI. Annexe des résultats.....	141
Discussion Générale	143
Références Bibliographiques.....	148
Publications scientifiques issues de cette thèse	187

Liste des Abréviations

A

ABP : "actin-binding protein"
ACGal : "cholesteryl 6-O-acyl- β -D-galactopyranoside"
ADN : acide désoxyribonucléique
AFM : microscopie à force atomique
aGM1 : "asialo GM1"
ALPS : "amphipatic lipid packing sensor"
ARM : répétition armadillo
ATCC : "American Tissue Culture Collection"
ATP : adénosine triphosphate

B

BAR : "Bin, Amphiphysin, RSV 161/167"
BBFO : "broad band fluoreine optimized"
BCA : "bicinchoninic acid"
BHT : "butylated hydroxytoluene"
BSA : "bovine serum albumin"

C

CCM : chromatographie sur couche mince
CCW : "counter clockwise"
CEACAMS : famille des antigènes carcino-embryonique
CF : 5(6)-carboxyfluorescéine
CheY-P : CheY-phosphorylé
CM : "cytoplasmic membrane"
Cryo-EM : cryo-microscopie électronique
CTD : domaine C-terminal
CU : "chaperone-usheer"
CW : "clockwise"

D

DAF : "decay accelerating factor"
DAS : "dispersing aqueous solution"
DexPEG : dextran(éthylène glycol)
DLS : "dynamic light scattering"
DGDG : digalactosyldiacylglycérol
DMSO : diméthylsulfoxyde
DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DOPE : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPG : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DOPS : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-sérine
DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DPPE : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine
DSPC : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DSPE : 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoryléthanolamine

E

EAS : "encapsulated aqueous solution"
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA : éthylènediaminetétraacétique
EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique
EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogénique
ERM : ezrine, radixine et moésine
ESI : "electrospray ionization"
E/H : eau dans huile
E/H/E : eau dans huile dans eau

F

FAME : "fatty acid methyl ester"
FHIPEP : "flagellum/hypersensitive response/invasion protein export pore"
FRET : "Förster resonance energy transfer"

G

Gal β : β -galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
Gb3 : globotriaosylcéramide
GC-FID : chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GFP : "green fluorescent protein"
GIPC : glycosylinositolphosphorylcéramide
GLS : glycosphingolipides
GM : ganglioside
GM1 : "monosialotetrahexosylganglioside"
GP : polarisation généralisée
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GSS : "FlgG specific sequence"
GUV : "giant unilamellar vesicle"

H

HEPES : acide N-2-hydroxy-éthylpipérazine N'-2-éthanesulfonique

HUS : "haemolytic uremic syndrome"

I

IM : "inner membrane"

L

LB : "lysogeny broth"

LEE : "locus of enterocyte effacement"

LC-HRMS²/LC-MS : "chromatography/high resolution tandem mass spectrometry"

LOS : "lipid-in-oil solution"

LUV : "large unilamellar vesicle"

M

MAM : molécule d'adhésion multivalent

MAMP : motif moléculaire associé aux microorganismes

mce : "mammalian cell entry"

MDCK : "madin-darby canine kidney"

MGDG : monogalactosyldiacylglycérol

MS : membrane-supramembrane

N

NBD : N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)

NHS : N-hydroxysuccinimide

NTD : domaine N-terminal

O

OM : "outer membrane"

P

PBS : tampon phosphate salin

PC : phosphatidylcholine

PCC : coefficient de corrélation de Pearson

PDP : pyridyldithiol propionate

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

PG : phosphatidylglycérol

PI : phosphatidylinositol

PIP : phosphoinositide

PMF : force proton motrice

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine

POPG : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

PS : phosphatidylsérine

PSM : palmitoylsphingomyéline

PVA : "polyvinyl alcohol"

Q

QToF : "quadrupole time-of-flight"

R

RD : "reduction of dimensionality"

RMN : résonance magnétique nucléaire

RT : temps de rétention

S

SM : sphingomyéline

SMFS : "single molecule force spectroscopy"

SPR : résonance plasmonique de surface

SQDG : sulphoquinovosyldiacylglycérol

ST : *Salmonella enterica* Typhimurium

SUV : "small unilamellar vesicle"

T

TAG : triglycéride

Tir : "translocated intimin receptor"

TMD : longueur des domaines transmembranaires

T3SS : appareil de sécrétion de type III

U

UPEC : *Escherichia coli* uropathogénique

W

WT : "wild type"

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de base d'un glycérophospholipide.....	7
Figure 2 : Structure de base d'un sphingolipide.....	8
Figure 3 : Structure de base d'un stérol.....	8
Figure 4 : Modèle de la mosaïque fluide.....	9
Figure 5 : Dynamique lipidique membranaire.....	11
Figure 6 : Répartition asymétrique des lipides au sein des feuillet externe et interne de la membrane.....	12
Figure 7 : Protéines impliquées dans la redistribution de certains lipides entre les deux feuillet de la membrane.....	13
Figure 8 : Illustration des états physiques adoptés par la membrane lipidique.....	14
Figure 9 : Diagramme de phase ternaire entre le cholestérol, le 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine et le 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine.....	15
Figure 10 : Régulation des domaines membranaires par divers mécanismes.....	18
Figure 11 : Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité.....	20
Figure 12 : Principe de la formation de vésicules géantes par hydratation d'un film de bicouches lipidiques.....	21
Figure 13 : Illustration schématique de chambres d'électroformation.....	23
Figure 14 : Images de GUVs pendant leur électroformation sur fils de platine.....	23
Figure 15 : Modulation de la microstructure de l'hydrogel DexPEG.....	26
Figure 16 : Méthode de transfert d'émulsion E/H.....	28
Figure 17 : Méthode de la double émulsion en microfluidique.....	29
Figure 18 : Méthode de propulsion en système microfluidique.....	30
Figure 19 : Fonctionnement de la pico-injection en système microfluidique.....	31
Figure 20 : Utilisation des GUVs comme membrane biomimétique dans un large panel d'études...	32
Figure 21 : Les GUVs en biologie synthétique.....	33
Figure 22 : Architecture des prototypes des CU pili.....	36
Figure 23 : Architecture du pilus de type IV.....	37
Figure 24 : Assemblage du pilus par sortase chez <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	39
Figure 25 : Mécanisme d'assemblage du curli.....	40
Figure 26 : Schéma des sous-classes du système de sécrétion de type V.....	42
Figure 27 : Les propriétés biophysiques du flagelle pour atteindre de manière non-spécifique des surfaces.....	43
Figure 28 : Mécanisme de production d'adhésines suite au contact avec une surface.....	45
Figure 29 : Stratégies pour la thérapie anti-adhésion.....	46
Figure 30 : Structure du flagelle bactérien.....	48
Figure 31 : Système de sécrétion de type III flagellaire.....	50
Figure 32 : Structure prédictive de l'appareil de sécrétion de type III flagellaire et de l'injectosome.....	52
Figure 33 : Superposition des structures FliT seule et du complexe FliT-FliD ^C	53
Figure 34 : Interaction de FlhA ^C au niveau de sa région la plus conservée avec différents complexes chaperonne/substrat.....	54

Figure 35 : Polymérisation de l'anneau FliG par le mécanisme de domain-swap d'interactions intramoléculaires à intermoléculaires.....	55
Figure 36 : Echange moléculaire entre la rotation CW et CCW	56
Figure 37 : Modèle représentant la jonction adaptative entre l'anneau C et l'anneau MS	57
Figure 38 : Structure des stators formés par les complexes MotA ₄ MotB ₂	58
Figure 39 : Comparaison de l'organisation axiale des différents constituants du flagelle	59
Figure 40 : Structure du corps basal comportant la tige.....	60
Figure 41 : Structure du coude flagellaire	61
Figure 42 : Comparaison des modèles atomiques de la tige et du coude et leur assemblage axial...	62
Figure 43 : Mécanisme intermittent de sécrétion régissant la taille du coude	63
Figure 44 : Schéma du filament flagellaire en all-atom et coarse-graining.....	65
Figure 45 : Mécanisme d'élongation du filament par le modèle d'injection-diffusion.....	66
Figure 46 : Mécanisme de polymérisation de la flagelline orchestrée par la coiffe FliD et sa structure	67
Figure 47 : Assemblage coordonné du flagelle par le régulon flagellaire	69
Figure 48 : Représentation schématique au niveau des gènes du fonctionnement de la variation de phase chez <i>Salmonella enterica</i>	71
Figure 49 : Fonctionnement d'une extrudeuse Liposofast	75
Figure 50 : Courbe d'étalonnage du dosage protéinique par BCA à partir d'une gamme étalon de BSA.....	80
Figure 51 : Montage microscope scellé avec du Parafilm	80
Figure 52 : Courbe d'étalonnage du dosage de Stewart à partir d'une gamme étalon d'egg-PC	86
Figure 53 : Schéma de formation de la bicouche découplée du support par des chaînes PEG	92
Figure 54 : Spectre SPR de la réflectivité en polarisation TM et pour une longueur d'onde de 633 nm et un montage prisme en LaSFN9 (n=1,85) sur une lame de verre (n=1,514), 2 nm de chrome et 47 nm d'or vaporisé.....	93
Figure 55: Composition lipidique des phosphatidylcholines présentes dans egg-PC, résolue par LC-MS.....	99
Figure 56 : Formation de GUVs egg-PC par hydratation assistée par gel	100
Figure 57 : Visualisation de l'interaction entre bactéries et GUVs egg-PC sur différents supports .	102
Figure 58 : Comparaison de la motilité entre O157:H7 WT et O157:H7 Δ fliC à 37°C pendant 10 h.	103
Figure 59 : Interaction entre un GUV egg-PC avec EHEC O157:H7 Δ fliC et WT	103
Figure 60 : Interaction entre le flagelle de ST et les GUVs egg-PC.....	104
Figure 61 : Les étapes de la quantification de l'adhésion bactérienne sur liposomes.....	105
Figure 62 : Immobilisation des liposomes sur lame d'or durant le test d'adhésion	106
Figure 63 : Relation entre la quantité de GUVs déposées et l'adhésion bactérienne	107
Figure 64 : Tests de motilité pour O157:H7 et ST à 37°C pendant 7 h.....	108
Figure 65 : Adhésion de EHEC O157:H7 et ST sur GUVs egg-PC	109
Figure 66 : Le flagelle et sa motilité augmentent l'adhésion bactérienne	110
Figure 67 : Impact de la variabilité de taille des GUVs sur l'adhésion bactérienne	112
Figure 68 : Adhésion d'O157:H7 WT sur GUVs avec des compositions lipidiques variant au niveau des têtes polaires	114
Figure 69 : Adhésion d'O157:H7 WT sur des GUVs possédant des compositions lipidiques avec une quantité molaire croissante de MGDG.....	115

Figure 70 : Adhésion d'O157:H7 WT sur plusieurs phosphatidylcholines variant au niveau de leurs chaînes grasses	116
Figure 71 : Effet de la présence d'acides gras C16:0 ou C18:3 dans le milieu de culture sur la composition lipidique de HT29.....	118
Figure 72 : Adhésion d'O157:H7 WT et $\Delta fliC$ sur cellules HT29 dont la composition lipidique a été modifiée.....	119
Figure 73 : Adhésion bactérienne via le flagelle dépend de l'ordre lipidique, avec un potentiel effet de la charge des lipides	120
Figure 74 : Polarisation généralisée du Laurdan en présence de flagelles H7 sur liposomes d'egg-PC de différentes tailles.....	123
Figure 75 : Adhésion de EHEC O157:H7 et ST sur des liposomes egg-PC mesurant 400 nm et 7,5 μ m	124
Figure 76 : Détermination de l'hydrophobicité des flagelles méthylés FliC et FljB et des flagelles non méthylés FliC $\Delta fliB$ et FljB $\Delta fliB$	125
Figure 77 : Adhésion de plusieurs souches de ST avec leur mutant respectif $\Delta fliB$ sur GUVs egg-PC, ainsi que leur motilité.....	126
Figure 78 : Evolution de l'ordre lipidique de DPPC par GP du Laurdan en présence ou non de flagelles H7	127
Figure 79 : Effet de la fluidité sur l'adhésion d'O157:H7 par utilisation du DOPC ($\Delta 9$ -Trans)	128
Figure 80 : Diagramme ternaire POPC/PSM/Cholestérol à 23°C	130
Figure 81 : Etude de l'adhésion d'O157:H7 WT et $\Delta fliC$ sur des GUVs mimant la ségrégation lipidique.....	131
Figure 82 : Insertion du flagelle et interaction avec les chaînes hydrophobes de la membrane	132
Figure 83 : Hétérogénéité de l'adhésion bactérienne due à la diversité de fluidité membranaire et une possibilité d'interaction spécifique du flagelle à la frontière des domaines ordonnés et désordonnés.....	133
Figure 84 : Compilation des caractéristiques obtenues pour chaque membrane.....	134
Figure 85 : Corrélation de Pearson entre l'épaisseur de la membrane, la distance pic à pic, l'aire par lipide, le potentiel d'interaction entre les chaînes carbonées et les niveaux d'adhésion d'O157:H7 WT	136
Figure 86 : Disparition de fragments de flagelle de ST sous la membrane, observée par microscopie électronique	137
Figure 87 : Relargage carboxyfluorescéine à partir de GUVs POPC de 2 μ m après 1 h en présence de diverses souches d'O157:H7	138
Figure 88 : Détermination de la constante de dissociation entre la flagelline H7 et une bicouche d'egg-PC ou la G-actine	139
Figure 89 : Possible interaction du flagelle avec l'actine	140
Figure 90 : Vérification de la formation des GUVs pour tous les mélanges lipidiques utilisés.	141
Figure 91 : Contrôle de la stabilité des liposomes et de l'absence de réactivité du Laurdan vis-à-vis du flagelle	142

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Variation de la composition lipidique de la membrane plasmique chez les animaux et les plantes	6
Tableau 2 : Récapitulatif des souches bactériennes utilisées durant cette étude.....	76
Tableau 3 : Composition des gels de séparation et de concentration utilisés pour le SDS-PAGE	79
Tableau 4 : Mélanges lipidiques pour l'étude de l'implication de la tête polaire dans l'interaction flagelle/phospholipides et de leur potentiel zêta	113
Tableau 5 : Proportion lipidique molaire réelle de chaque mélange lipidique.....	142
Tableau 6 : Taux d'immobilisation sur l'or des GUVs pour chaque composition lipidique	142

Introduction

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC) est une bactérie souvent impliquée dans des épidémies d'origine alimentaire. Elle est connue pour la sévérité des symptômes qu'elle engendre qui inclut des diarrhées sanglantes ou encore le syndrome hémolytique et urémique (HUS, pour *Hemolytic Uremic Syndrome*), provoquée par la sécrétion de toxines Shiga. Il se traduit par des dysfonctionnements rénaux, une diminution du nombre de cellules sanguines, allant jusqu'à des complications neurologiques irréversibles. Le réservoir principal des EHEC se situe dans le tube digestif des bovins, porteurs sains de ces bactéries, et sont donc à l'origine des contaminations. Elles peuvent provenir aussi bien de la viande à cause du non-respect des procédures d'hygiène lors de l'abattage, que des végétaux à partir de la dissémination de matières fécales dans l'environnement, notamment au niveau des engrais, de l'eau ou du sol. Pour exemple, en 2011 une épidémie importante à partir de graines germées de fenugrec a enregistré plus de 4 300 victimes, dont au moins 800 personnes hospitalisées et 50 personnes décédées, en Allemagne et en France (Grad *et al.* 2012). Plus d'une dizaine d'années plus tôt, une épidémie similaire s'était produite au Japon et a impliqué cette fois-ci 8 500 victimes. O157:H7, l'un des sérotypes les plus répandus, fut identifié comme à l'origine de cette épidémie (Fukushima *et al.* 1999).

Lorsque des aliments contaminés sont ingérés, les entérobactéries pathogènes envahissent l'épithélium intestinal grâce à leurs flagelles, conférant aussi la propulsion nécessaire pour franchir le mucus protégeant la cellule. L'étape charnière entre ce moment et la pathogénicité de la bactérie est l'adhésion, sur la membrane plasmique, qui constitue l'ultime barrière de la cellule. Le mécanisme de l'interaction avec la membrane impliquant le flagelle demeure aujourd'hui inconnu. L'identification des mécanismes mis en jeu lors de l'adhésion bactérienne permettrait de cibler ce processus de manière stratégique, pour prévenir la virulence de pathogènes. Dans le contexte actuel où la résistance aux antibiotiques est exponentielle, les solutions anti-adhésion pourraient être un axe alternatif. D'après un rapport alarmant de 2016, la résistance aux antibiotiques deviendrait, en 2050, la première cause mondiale de mortalité¹. Concrètement une simple blessure qui s'infecte ne pourrait ne plus être soignée et donc être lourde de conséquences. L'intérêt de cibler le flagelle est qu'il intervient dans des étapes précoces de la colonisation et de l'adhésion de par sa rotation et sa longueur. L'objectif de ce travail est, par conséquent, de comprendre les paramètres mis en jeu lors de l'adhésion du

¹ The review on antimicrobial resistance, sous la direction de Jim O'Neill, mai 2016

flagelle sur la membrane plasmique, en se focalisant sur la contribution des propriétés physico-chimiques de la bicouche lipidique.

Dans ce manuscrit, une synthèse bibliographique est consacrée aux deux protagonistes de ce travail, à savoir la membrane plasmique et le flagelle bactérien. D'une part, les caractéristiques et la complexité de la membrane plasmique sont présentées, avec une partie dédiée aux liposomes unilamellaires géants (GUV, pour *Giant Unilamellar Vesicle*), qui est le modèle biomimétique utilisé au cours de cette étude. Leurs techniques d'obtention, ainsi que leurs applications, notamment l'étude de la membrane plasmique, y sont indiquées. D'autre part, le processus d'adhésion, les principales adhésines bactériennes et le développement de solutions anti-adhésion sont décrits, incluant en particulier des détails sur la composition, l'assemblage ainsi que la structure du flagelle. Les résultats expérimentaux sont ensuite organisés sous quatre chapitres. L'appropriation du modèle biomimétique de l'étude, ainsi que l'impact de phénotypes flagellaires au niveau de l'adhésion bactérienne sur les GUVs sont présentés dans le premier chapitre. De façon complémentaire, l'adhésion en fonction des têtes polaires, puis des chaînes carbonées des lipides est étudiée dans le second chapitre. Le troisième chapitre s'intéresse, quant à lui, d'une part à la nature de l'adhésion, et d'autre part à l'adhésion bactérienne sur des GUVs mimant la ségrégation de phases. Enfin, le dernier chapitre revient sur l'ensemble des paramètres clés de l'adhésion, pour comprendre leur contribution respective. La possibilité d'une interaction intervenant au-delà de la bicouche lipidique est également étudiée. Une discussion générale clôture ce manuscrit en revenant sur les principales caractéristiques de l'adhésion entre le flagelle bactérien et la bicouche lipidique, en mettant en avant les nouvelles questions résultant de ce travail.

Synthèse Bibliographique

I. La membrane plasmique

La membrane plasmique ou cellulaire est la frontière séparant l'intérieur de la cellule de son environnement extérieur. Elle constitue l'une des premières barrières de la cellule face aux pathogènes. C'est un lieu où s'exerce de nombreuses fonctions essentielles à la vie de la cellule.

La théorie cellulaire, postulée dans les années 1830 par Matthias Jakob Schleiden et Theodor Schwann, demeure fondamentale en biologie. Les bases de cette théorie sont que tous les organismes végétaux et animaux se composent de cellules, unités fondamentales et structurelles du vivant fonctionnant de manière autonome, et que les cellules proviennent de cellules préexistantes. Ces principes ont évolué pour donner la théorie cellulaire telle que nous la connaissons aujourd'hui, qui statue en particulier que la multiplication cellulaire résulte de la division cellulaire (Mazzarello 1999). A la fin du XIX^e siècle, la plupart des constituants de la cellule ont été décrits : le cytoplasme, le noyau, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et l'appareil de Golgi. Quant aux membranes, leur existence n'était pas unanimement admise car elles demeuraient invisibles au microscope. A l'époque, la membrane cellulaire était souvent assimilée à la paroi cellulaire des plantes. Ainsi la membrane plasmique, de même que les autres membranes, étaient considérées comme une structure secondaire facultative. Au cours du siècle suivant, l'existence de la membrane plasmique a été progressivement acceptée grâce à l'apport d'éléments physicochimiques propres à sa nature et sa structure. Parmi eux, les études sur la perméabilité de la membrane plasmique de Charles Ernest Overton, les mesures de conductivité cellulaire de Rudolf Höber et le travail de micro-injection sur cellule de Robert Chambers ont démontré que la membrane plasmique existait et qu'elle possédait une nature différente du cytoplasme (Lombard 2014).

1. La nature lipidique de la membrane plasmique

1.1. Une bicouche lipidique

Une avancée majeure sur la description de la structure moléculaire de la membrane fut apportée par Evert Gorter et François Grendel en 1925. Après extraction des lipides d'un échantillon d'érythrocytes, ces chercheurs ont déterminé que la surface d'une monocouche à l'interface air/eau était deux fois égale à la surface des cellules. Ces cellules ne possédant qu'une membrane plasmique, ils en ont conclu que celle-ci était organisée en bicouche de lipides, avec les têtes polaires exposées vers l'environnement extérieur et les parties hydrophobes regroupées

à l'intérieur de la bicouche (Gorter et Grendel 1925). La microscopie électronique permet ensuite de visualiser directement la membrane plasmique, décrite comme une ligne de chemin de fer (Robertson 1960). Cette caractéristique a été également observée sur les premières bicouches lipidiques artificielles, prouvant que des molécules amphiphiles étaient capables de former une frontière (Henn *et al.* 1967; Mueller *et al.* 1962; Tien et Diana 1967). Ceci est dû aux propriétés des lipides de s'auto-assembler en bicouche, grâce à leur nature amphiphile. Ils s'agencent de manière à ce que leur tête polaire soit vers l'environnement aqueux, alors que les chaînes carbonées s'associent ensemble à l'intérieur de la membrane *via* des forces de Van Der Waals (Tanford 1978).

1.2. La diversité lipidique

Les lipides membranaires se divisent en plusieurs catégories : les glycérophospholipides, les stérols et les sphingolipides. Ces derniers appartiennent à une famille complexe de molécules incluant les céramides, les sphingomyélines et les glycosphingolipides.

Le réticulum endoplasmique abrite le lieu principal de synthèse des lipides que ce soit les glycérophospholipides ou le cholestérol. C'est également dans cet organite que sont synthétisés les céramides, précurseurs des sphingolipides, dont la synthèse se poursuit dans l'appareil de Golgi. Les lipides sont ensuite transportés et répartis dans les différents organites ayant des compositions différentes, par exemple il y a très peu de sphingolipides et de cholestérol dans la membrane du réticulum endoplasmique (van Meer *et al.* 2008). La composition lipidique varie fortement en fonction du type de cellule et d'organisme (Tableau 1).

Tableau 1 : Variation de la composition lipidique de la membrane plasmique chez les animaux et les plantes (Furt et al. 2011; Sampaio et al. 2011)

Proportion lipidique (pourcentage total de lipides)	Cellule épithéliale polarisée de foie (MDCK)	<i>Avena sativa</i> (Coléoptile)	<i>Avena sativa</i> (Racine)
Glycérophospholipides	62%	42%	50%
Sphingolipides	8%	26%	10%
Stérol	28%	32%	40%

1.2.1. Glycérophospholipides

Les glycérophospholipides se composent d'un squelette de glycérol, sur lequel sont estérifiées deux chaînes d'acide gras en position *sn*-1 et *sn*-2 (Figure 1). La tête polaire

positionnée en *sn*-3 est constituée d'acide phosphorique, dont l'un des groupements acides est estérifié par un alcool (éthanolamine, choline, sérine, inositol, glycérol, ...). La chaîne grasse, en *sn*-1 peut varier de 14 à 22 carbones, mais les longueurs de 16 et 18 carbones sont les plus représentés chez l'Homme. Cette chaîne est très souvent saturée, contrairement à la chaîne en position *sn*-2, elle-même souvent plus longue (Harayama et Riezman 2018).

Le principal glycérophospholipide est la phosphatidylcholine, qui compte pour plus de 50% des phospholipides dans la plupart des cellules eucaryotes. La phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, la phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique sont les autres glycérophospholipides retrouvés dans ces membranes. Ce dernier est le précurseur commun à l'ensemble des glycérophospholipides (Athenstaedt et Daum 1999). Il est obtenu chez les mammifères par le biais du glycérol-3-phosphate ou du dihydroxyacétone phosphate (Vance 2015).

Chez les plantes, une partie des phospholipides de la membrane plasmique peut être remplacée, dans des conditions dépourvues de phosphate, par un glycolipide, le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) (Andersson *et al.* 2003). Ce lipide se trouve principalement dans la membrane photosynthétique des chloroplastes, appelée thylakoïde, qui se compose aussi d'autres lipides sans phosphate tels que le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le sulphoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (Benning 2009).

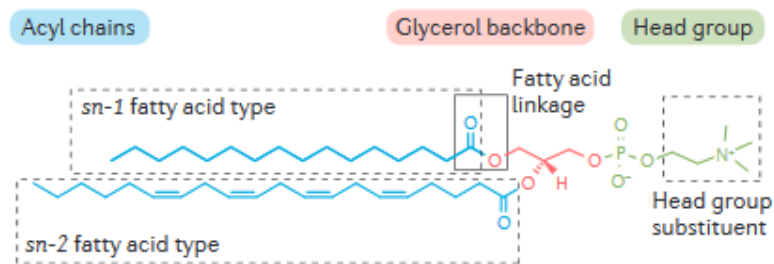


Figure 1 : Structure de base d'un glycérophospholipide, ici le 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Harayama et Riezman 2018)

1.2.2. Sphingolipides

Les sphingolipides sont composés d'une base sphingoïde liée *via* une liaison amide à une chaîne d'acide gras, très souvent plus longue et plus saturée que celle des glycérophospholipides, nommée chaîne N-acyl (Grösch *et al.* 2012) (Figure 2). Il n'y a aucune diversité dans le type de base sphingoïde présent chez les animaux et les levures, contrairement aux plantes qui peuvent adopter jusqu'à 8 types de base différents (Furt *et al.* 2011). Quant à la tête polaire, la

substitution de l'alcool primaire par la phosphatidylcholine permet le passage d'un céramide à la sphingomyéline, cette dernière n'existant pas chez les plantes. Dans le cas des glycosphingolipides, une chaîne d'un ou plusieurs saccharides est liée par une liaison β -osidique au céramide. Chez les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, les glycosphingolipides représentent quasiment 100% des sphingolipides, dont plus de la moitié correspond aux glycosylinositolphosphorylcéramides (GIPC), un lipide spécifique aux plantes (Markham *et al.* 2006).

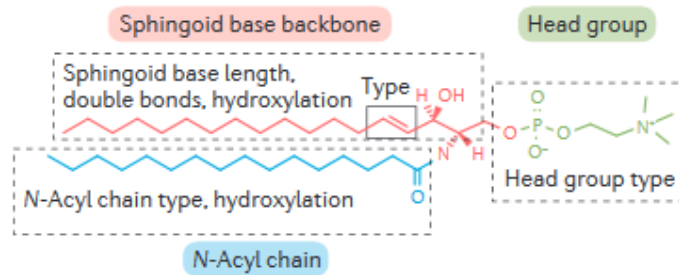


Figure 2 : Structure de base d'un sphingolipide, ici la sphingomyéline (Harayama et Riezman 2018)

1.2.3. Stérols

Présents dans les cellules eucaryotiques, les stérols sont des constituants majeurs de la membrane plasmique pouvant atteindre 40% et 30% en proportion molaire, respectivement chez les animaux et les plantes (Cacas *et al.* 2016; Lange *et al.* 1989; van Meer et de Kroon 2011). Ces constituants comportent une chaîne aliphatique à l'extrémité d'un enchaînement de 4 cycles, appelé noyau stéroïde, et d'un groupement hydroxyle responsable de leur nature amphiphile (Figure 3).

Chez les animaux, le cholestérol est le seul stérol présent dans la membrane cellulaire, contrairement aux plantes qui détiennent plusieurs dizaines de stérols. Ces derniers, les phytostérols, peuvent être conjugués avec un ou plusieurs résidus carbohydrates, couramment le D-monoglucopyranoside, pouvant être lui-même acétylé.

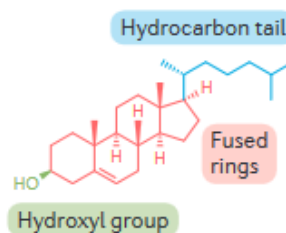


Figure 3 : Structure de base d'un stérol, ici le cholestérol (Harayama et Riezman 2018)

2. Le modèle de la mosaïque fluide

En plus des lipides, la membrane plasmique abrite des protéines. Leur positionnement dans la membrane a donné lieu à plusieurs modèles, notamment le modèle paucimoléculaire dans lequel la bicouche lipidique est entourée de chaque côté d'une monocouche de protéines (Danielli et Davson 1935). Plusieurs éléments viendront contredire ce modèle, en particulier l'observation de l'intérieur de la bicouche lipidique, grâce à la technique de cryofracture laissant ainsi apparaître des aspérités, les protéines transmembranaires (Branton 1966; Deamer et Branton 1967). De plus, des études sur la structure tertiaire des protéines confirmeront que certaines d'entre-elles possèdent des structures en hélice α , et peuvent donc s'insérer dans la bicouche lipidique par le biais d'interactions hydrophobes (Stoeckenius et Engelman 1969).

En 1972, Singer et Nicholson proposent le modèle de la mosaïque fluide (Figure 4). Le terme « mosaïque » fait référence au mélange lipides/protéines intrinsèques, alors que le terme « fluide » fait référence à la dynamique de la membrane en se référant à la mobilité de ses composants (Singer et Nicholson 1972). Quelques années plus tôt, cette fluidité avait été démontrée en fusionnant une cellule humaine et une cellule de souris, possédant chacune des antigènes spécifiques marqués à l'aide d'anticorps fluorescents de différentes couleurs. Les deux types d'antigènes, au départ aux extrémités de cette cellule hybride, se mélangèrent au cours du temps démontrant la diffusion latérale de la membrane (L. D. Frye et Edidin 1970).

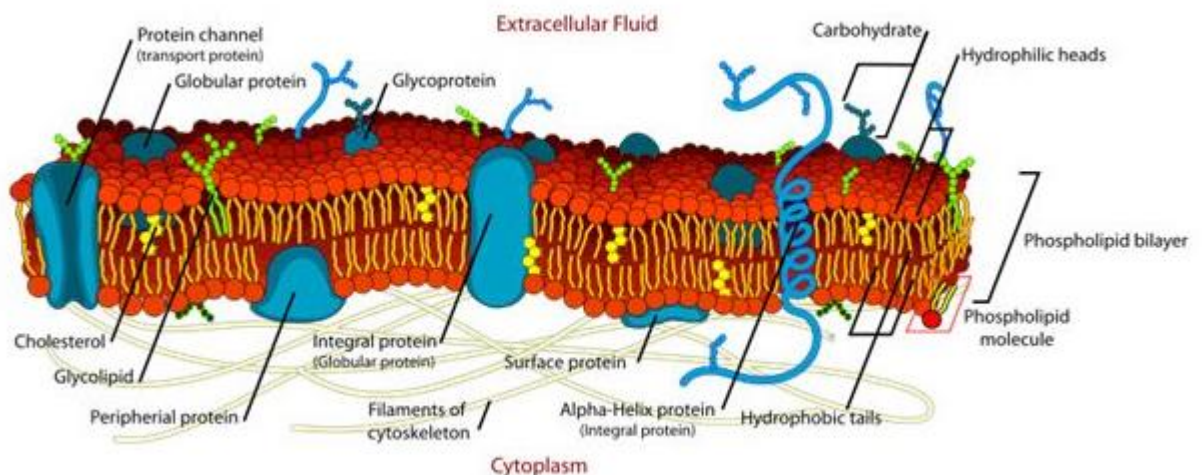


Figure 4 : Modèle de la mosaïque fluide, comprenant un mélange fluide et dynamique des différents types de protéines mêlés à la bicouche lipidique, sous l'effet de certains éléments de la membrane ou provenant de l'extérieur comme les filaments du cytosquelette (Mariana Ruiz Villarreal)

2.1. Une mosaïque de composants

Les lipides représentent en moyenne la moitié de la masse de la membrane cellulaire, l'autre moitié étant attribuée aux protéines. La membrane plasmique est également composée de carbohydrates couplés soit aux lipides soit aux protéines, et sont ainsi appelés respectivement glycolipides et glycoprotéines.

Les protéines se répartissent en trois catégories : les protéines intrinsèques ou intégrales, les protéines extrinsèques ou périphériques et les protéines ancrées. Les protéines intégrales sont enfouies profondément dans la bicouche lipidique, car elles possèdent, de manière analogue à certains lipides, une nature amphiphile. Les protéines périphériques s'associent à la surface de la membrane *via* des interactions de faible énergie, polaires ou électrostatiques, et sont donc facilement dissociables de la membrane (McLaughlin et Murray 2005). Cependant, les propriétés physico-chimiques de la membrane, telles que la courbure ou le défaut d'ordre lipidique, peuvent être impliquées dans le recrutement de certaines protéines périphériques. Par exemple, les protéines comportant des domaines BAR (Bin, Amphiphysin, RSV 161/167) ou des motifs ALPS (*Amphipatic Lipid Packing Sensor*) se positionnent au niveau de sections courbées de la membrane (Bigay et Antony 2012). Les protéines ancrées, comme leur nom l'indique, sont liées de manière covalente à un lipide, comme le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cette ancre lipidique permet à ces protéines de s'insérer dans la membrane.

2.2. Fluidité membranaire

La membrane est une structure dynamique grâce à la mobilité de ses constituants au sein de celle-ci. De manière plus précise, la diffusion des lipides appelée fluidité membranaire se caractérise par trois principaux déplacements : le mouvement latéral, le mouvement de rotation et le flip-flop (Figure 5b). Néanmoins, la fluidité membranaire est modulée par divers paramètres comme la phase membranaire, puisque les mouvements moléculaires sont plus restreints en phase gel qu'en phase fluide.

Le mouvement latéral correspond à l'échange de place d'une molécule de lipide avec une molécule de lipide voisine, et se traduit par le coefficient latéral de diffusion C_D , qui se trouve typiquement entre 10^{-7} à 10^{-10} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Destainville *et al.* 2008). Cet échange, se produisant fréquemment, nécessite moins d'une seconde pour s'effectuer. Le mouvement de rotation est, quant à lui, relié au coefficient de diffusion rotationnel, qui correspond à la rotation angulaire du

lipide sur lui-même en quelques nanosecondes. L'isomérisation de *cis* à *trans* des insaturations est également dynamique (Figure 5a).

A l'inverse, le passage d'un lipide d'un feuillet à l'autre, appelé flip-flop, est thermodynamiquement défavorable. Lors de ce mouvement, la tête polaire doit se retrouver en contact avec le cœur hydrophobe de la bicouche. Par conséquent, ce déplacement requiert plusieurs heures, voire plusieurs jours pour s'accomplir (Parisio *et al.* 2016). En revanche grâce à sa partie hydrophile beaucoup plus petite que chez les phospholipides, la diffusion transversale du cholestérol est plus fréquente et se produit en moins d'une seconde (Hamilton 2003).

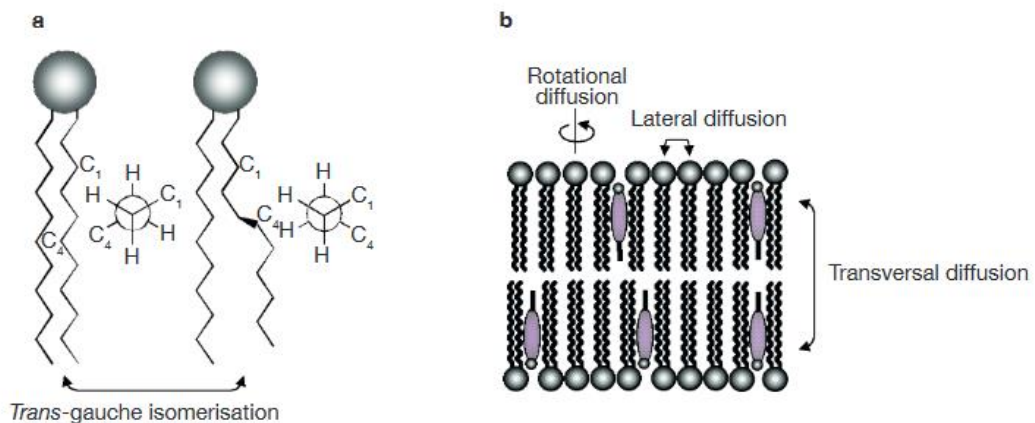


Figure 5 : **Dynamique lipidique membranaire.** (a) Isomérisation des insaturations lipidiques. (b) Mobilité des lipides dans la membrane avec les mouvements latéral, rotationnel et transversal (Eeman et Deleu 2010)

3. Hétérogénéité des caractéristiques de la membrane

3.1. Asymétrie transmembranaire

Les membranes cellulaires ont une répartition asymétrique de leurs composants, notamment des lipides entre leurs deux feuillets, c'est-à-dire que la composition lipidique du feuillet intérieur est différente du feuillet extérieur de la bicouche (Bretscher 1972). Cette asymétrie est indispensable à l'établissement d'un potentiel électrique transmembranaire, ainsi qu'à la régulation de certaines fonctions (Fadeel et Xue 2009). Entre autres exemples, l'exposition de phosphatidylsérines sur la surface de la membrane, survenant pendant l'apoptose, sert de signal aux macrophages (Bratton *et al.* 1997).

Cette asymétrie est influencée par la géométrie adoptée par les lipides, celle-ci étant définie par la taille de la tête polaire et par la surface occupée de leurs chaînes grasses (Israelachvili *et al.* 1976). La phosphatidylcholine possède une géométrie cylindrique et les sphingolipides une forme conique inversée. En revanche la phosphatidyléthanolamine, à cause

de la petite taille de sa tête polaire, présente une géométrie conique et ainsi une tendance à la courbure négative. Finalement, le feuillet interne est principalement composé de phosphatidyléthanolamine, de phosphatidylsérine, de phosphatidylinositol et de phosphoinositide, alors que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont majoritairement retrouvées au niveau du feuillet externe (Marquardt *et al.* 2015) (Figure 6). Ainsi, le feuillet interne est globalement chargé positivement, contrairement au feuillet externe qui est plutôt neutre (zwitterionique). Quant au cholestérol, celui-ci se répartirait de manière plus ou moins égale entre les deux feuillets (Steck et Lange 2018).

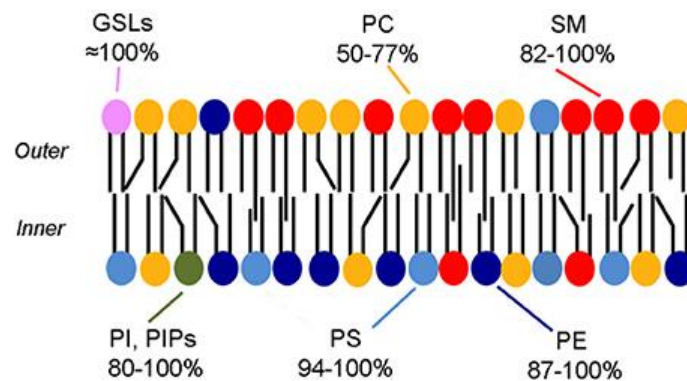


Figure 6 : Répartition asymétrique des lipides au sein des feuillets externe (outer) et interne (inner) de la membrane. GSL : glycosphingolipides ; PC : phosphatidylcholine ; SM : sphingomyéline ; PI : phosphatidylinositol ; PIP : phosphoinositides ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine (Fujimoto et Parmryd 2017)

Les glycolipides font exclusivement face à l'environnement extracellulaire et forme avec les glycoprotéines et une partie des protéoglycanes, le glycocalyx. Cette barrière physique protectrice, chargée négativement, joue principalement un rôle dans la reconnaissance et la régulation de l'adhésion cellulaire. De nombreux pathogènes se lient *via* leurs adhésines sur ces motifs carbohydrates, comme le P-pilus d'*Escherichia coli* uropathogénique (UPEC) au niveau des cellules de la voie urinaire supérieure (Dodson *et al.* 2001; Väisänen *et al.* 1981). De manière remarquable, le glycocalyx des cellules endothéliales est capable de « sentir » les forces de cisaillement de la circulation sanguine, et si besoin d'induire par plusieurs mécanismes la correction de ses caractéristiques rhéologiques (Ushiyama *et al.* 2016).

La redistribution des lipides dans les différents feuillets est effectuée par des protéines intégrales spécifiques (Daleke 2003; Hankins *et al.* 2015) (Figure 7) :

- les ATPases de type 4, appelées flippases, qui déplacent spécifiquement certains lipides du feuillet externe vers le feuillet interne de manière ATP-dépendant,

- les ABC-transporteurs, appelés floppases, qui déplacent dans le sens inverse des flippases toujours de manière spécifique et ATP-dépendent,
- les scramblases, qui effectuent des échanges de manière aléatoire dans les deux sens, indépendamment de l'utilisation de l'ATP.

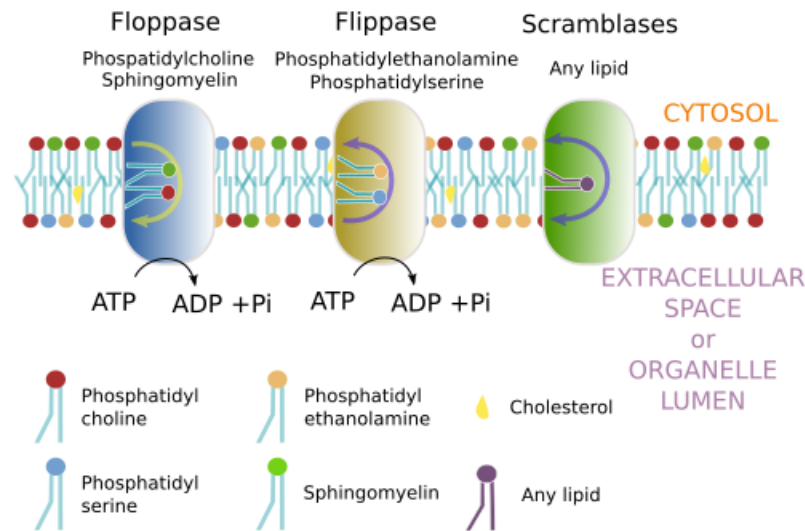


Figure 7 : Protéines impliquées dans la redistribution de certains lipides entre les deux feuillet de la membrane (Adaptée de Quazi et Molday 2011)

3.2. Polymorphisme membranaire

Les membranes lipidiques existent sous différents états physiques, qui peuvent coexister sur une même membrane (Heberle *et al.* 2010; Janiak *et al.* 1979) (Figures 8 et 9). La phase gel L_{β} ou solide ordonné S_0 se caractérise par une bicouche lipidique extrêmement compacte et organisée en treillis triangulaire, due à l'élongation maximale des chaînes grasses et une conformation en *trans* des insaturations. En fonction du niveau d'hydratation et de la nature de la tête polaire, les chaînes grasses peuvent plus ou moins se décaler par rapport à l'axe formé par deux lipides axiaux de chaque feuillet et ainsi diminuer l'épaisseur de la bicouche lipidique, formant la phase gel L_{β}' . A température plus élevée en phase fluide L_{α} ou liquide désordonnée L_d , la surface latérale des lipides augmente, de par l'isomérisation des doubles liaisons, résultant en une structure désorganisée qui permet une diffusion plus libre des lipides. La transition entre ces deux phases se produit à une température bien précise appelée température de transition T_m , qui diffère principalement en fonction de la nature du lipide. Ainsi, la présence de chaînes d'acide gras plus courtes diminue la T_m , à cause d'une interaction moins profonde avec les autres chaînes

grasses, tout comme les insaturations, en particulier en configuration *cis* dont le coude génère l'empilement lipidique.

Pour certains lipides comme la phosphatidylcholine, une pré-transition à des températures proches de la T_m peut exister donnant lieu à un état d'ondulation P_β . Cet état se caractérise par une ondulation périodique à la surface de la bicouche, qui serait causée par une alternance de domaines ordonnés et désordonnés (Kaasgaard *et al.* 2003). Cette périodicité, dont la longueur d'onde varie, est linéaire mais peut changer de direction selon des angles de 60° ou de 120° .

La présence de cholestérol provoque une phase hybride entre un solide ordonné et un liquide désordonné. Cette phase, appelée liquide ordonné L_o , possède une structure ordonnée des chaînes grasses tout en gardant une diffusion latérale proche de la phase fluide (Ipsen *et al.* 1987). En effet, l'ajout de cholestérol en phase gel va désorganiser le treillis triangulaire des lipides, *a contrario* en phase fluide le cholestérol va favoriser les configurations *trans* des insaturations et ainsi une organisation plus ordonnée (Sankaram et Thompson 1990). Les phytostérols conjugués ou non sont également capables d'induire cet effet de manière plus ou moins identique, en fonction de leur différence structurale avec le cholestérol (Grosjean *et al.* 2015).

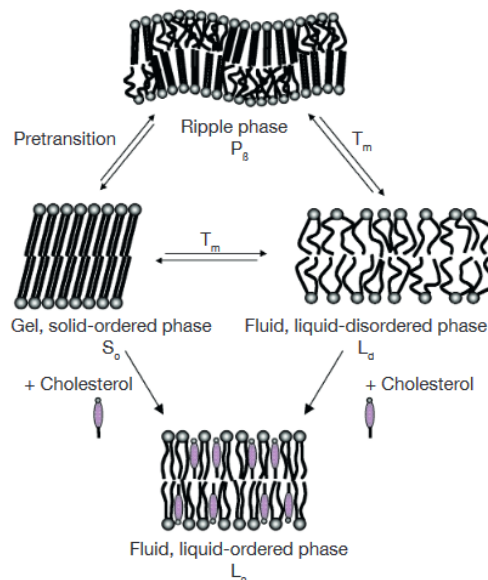


Figure 8 : Illustration des états physiques adoptés par la membrane lipidique. T_m : Transition principale de phase (Eeman et Deleu 2010)

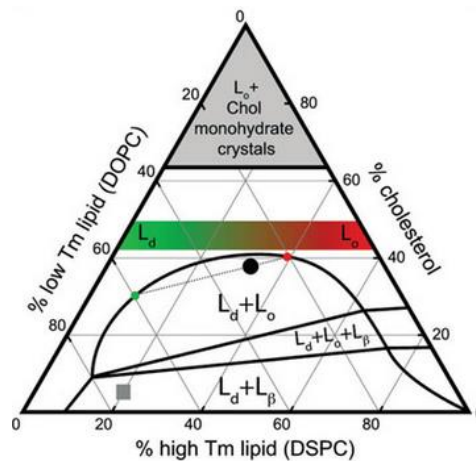


Figure 9 : Diagramme de phase ternaire entre le cholestérol, le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC ; $T_m = -17^\circ\text{C}$) et le 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC ; $T_m = 55^\circ\text{C}$). Plusieurs phases peuvent coexister, la composition au niveau du rond noir donne lieu à environ 25% de liquide désordonné et 75% de liquide ordonné. L_d : liquide désordonné ; L_o : liquide ordonné ; L_β : solide ordonné (Dick et Vogt 2014)

4. Partition de la membrane

Le modèle de la mosaïque fluide, révisé en 2014, est toujours considéré comme une référence pour la description de la structure de la membrane plasmique. La révision du modèle a mis principalement l'accent sur l'environnement de la membrane (Nicolson 2014). Celle-ci n'est pas isolée du reste de la cellule et interagit avec des éléments extra- et intracellulaires, en particulier le cytosquelette. Ces interactions peuvent conduire à des restrictions de mobilité, participer à la ségrégation de phases lipidiques et à la création de clusters protéiques.

4.1. Existence des clusters lipidiques ?

La dynamique de la membrane, modulée par son environnement, conduit à la formation de micro-domaines permanents, notamment dans les cellules épithéliales polarisées. C'est la jonction entre deux cellules adjacentes séparant les domaines apical et basolatéral, qui empêcherait le déplacement des lipides et protéines d'un domaine à l'autre (Giepmans et van Ijzendoorn 2009; van Meer et Simons 1986). De même chez les plantes, la membrane plasmique d'un grain de pollen se décompose en 4 domaines distincts. Des domaines plus petits et transitoires sembleraient également exister (Sezgin *et al.* 2017).

Ces nano-domaines correspondraient aux domaines composés principalement de cholestérol et de sphingolipides appelés radeaux lipidiques (en anglais, *lipid rafts*), isolés à l'aide de détergents. Cette fraction de la membrane, résistante aux détergents, présente une phase liquide ordonné coexistant avec une phase liquide désordonné sensible, elle, aux détergents

(Simons et Ikonen 1997). Leur existence réelle dans les membranes biologiques est sujette à de nombreux questionnements, puisque la variation des paramètres d'extraction comme la température conduit à des résultats différents (Mayor et Maxfield 1995). La création de modèles biomimétiques avec certains mélanges de lipides, mais aussi l'extraction de membranes entières (avec protéines) ont démontré *in vitro* des associations préférentielles lipidiques, dévoilées notamment à l'aide de sondes fluorescentes sensibles à l'environnement lipidique (Sezgin *et al.* 2012; Veatch et Keller 2003b). D'autres techniques comme les simulations de dynamique moléculaire ou encore la microscopie optique à super-résolution permettent d'étudier ces domaines particuliers, qui de par leur taille et leur durée de vie restent difficile à cerner, les clusters lipidiques n'ayant jamais pu être visualisé *in vivo* (Sezgin *et al.* 2017).

4.2. Relation entre nano-domaines et bactéries

Les radeaux lipidiques seraient souvent impliqués dans l'adhésion et l'entrée de pathogènes, en particulier les bactéries (Toledo et Benach 2015). *Shigella*, une bactérie non-motile, est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales en sécrétant l'invasine IpaB qui se lie au récepteur CD44. En revanche, l'invasion est altérée par l'absence de cholestérol ou sphingolipides (Lafont *et al.* 2002). Pendant l'infection, la réplication intracellulaire de *Shigella* entraîne une remodulation de la composition lipidique de la membrane par une sphingomyélinase, afin d'empêcher à nouveau l'adhésion de *Shigella* (Tawk *et al.* 2018). De même, les motifs moléculaires associés aux microorganismes (MAMP), tels que la flagelline, déclenchent la formation de complexes protéiques au niveau de la membrane en se liant aux récepteurs de leur hôte (Gronnier *et al.* 2018).

Même s'ils se différencient de par leur composition, les bactéries possèderaient également des nano-domaines très fonctionnalisés, formés par des hopanoïdes possédant un rôle et une structure proche du cholestérol, des caroténoïdes et des phospholipides (Lopez et Koch 2017). De nombreuses bactéries comme *Helicobacter* spp. et *Borrelia burgdorferi* utilisent le cholestérol de leur hôte. Cette dernière, à l'origine de la maladie de Lyme, est capable d'incorporer dans sa membrane ce cholestérol, tel quel ou transformé en cholestérol glycosylé. C'est donc à ce jour le seul procaryote potentiel à posséder des radeaux lipidiques comme il pourrait en exister chez les eucaryotes, bien que ne possédant pas de sphingolipides. En effet, le glycholestérol ACGal posséderait un rôle combinant celui du cholestérol et celui des sphingolipides (LaRocca *et al.* 2013).

4.3. Régulation des domaines

La formation de domaines est régulée principalement par l'interaction entre lipides, lipides et protéines ou par leur environnement proche, tel que la matrice extracellulaire ou le cytosquelette (Figure 11) (Nicolson 2014). Ce contrôle peut avoir lieu sur le même feuillet, celui-ci est alors qualifié de contrôle *cis*. Pour un contrôle transmembranaire, il est question de contrôle *trans*. Tous deux entraînent l'agrégation ou la ségrégation de protéines ou lipides formant ainsi des domaines (Nicolson 2014).

Certains lipides interagissent préférentiellement entre eux, comme le cholestérol avec les sphingolipides ou les glycérophospholipides saturés. Les protéines peuvent posséder des sites de liaison à des lipides spécifiques ou chercher à accorder leur partie hydrophobe avec celle des lipides. Plus la longueur du domaine transmembranaire est longue, plus la protéine se positionnerait dans un domaine épais, constitué de longues chaînes acyl saturées (Diaz-Rohrer *et al.* 2014). La concordance entre les domaines hydrophobes des protéines et des lipides est thermodynamiquement favorable (Jensen et Mouritsen 2004). Dans le cas contraire, les protéines auront tendance à s'agréger ensemble (Kaiser *et al.* 2011).

La diffusion des constituants de la membrane peut être contrainte par des interactions avec des éléments du cytoplasme comme le cytosquelette ou la matrice extracellulaire. Chez les plantes, les GIPCs se lient à la pectine rhamnogalacturonane II, appartenant à la paroi cellulaire (Voxeur et Fry 2014). Quant au cytosquelette, il semble jouer un rôle plus important dans la ségrégation de domaines. Une récente étude a montré que des complexes d'actomyosine sont impliqués dans l'agrégation de protéines ancrées GPI sur le feuillet externe, *via* un contrôle *trans* (Raghupathy *et al.* 2015).

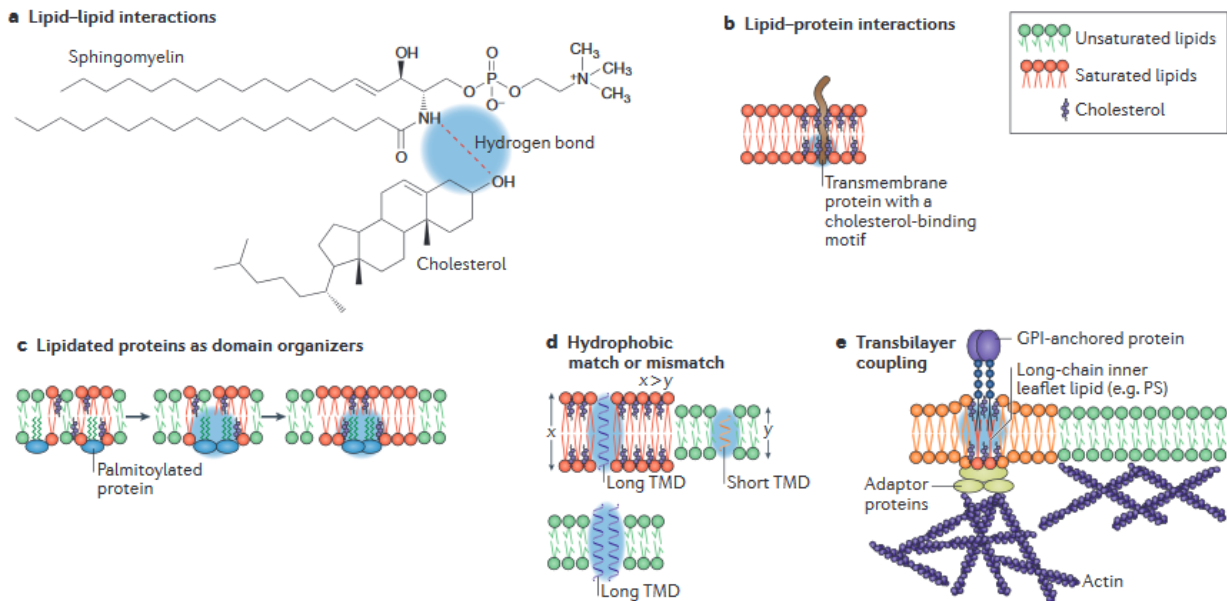


Figure 10 : Régulation des domaines membranaires par divers mécanismes : (a) des interactions préférentielles entre lipides, (b) un site de liaison particulier d'une protéine pour un lipide, (c) des protéines possédant des motifs palmitoylés, (d) accord ou désaccord de la longueur des domaines transmembranaires (TMD) des protéines avec la longueur des chaînes grasses lipidiques ou (e) action de l'actine via le feuillet interne (Sezgin et al. 2017)

4.4. Sous la membrane, le cytosquelette

La membrane plasmique et le cytosquelette sont intimement liés au niveau du cortex cellulaire, situé juste sous la membrane. En plus de participer à la ségrégation de domaines membranaires, le cytosquelette est impliqué en premier lieu dans de nombreuses autres fonctions comme le mouvement cellulaire, la division cellulaire ou le transport intracellulaire d'organites. Quant au cortex cellulaire, il contrôle particulièrement les déformations de la cellule (D. A. Fletcher et Mullins 2010).

Le cortex cellulaire est riche en fibres d'actine ou microfilaments. Mesurant environ 7 nm de diamètre, les fibres d'actine se composent de deux filaments de F-actine obtenus par polymérisation de la G-actine. Elles peuvent adopter plusieurs types de structure comme les fibres de stress, filopodes ou lamellipodes, sous le contrôle de plusieurs protéines régulatrices appelées *actin-binding proteins* (ABP), notamment la myosine II. Cette dernière est indispensable à la fonction du cortex cellulaire, car il s'agit de l'élément principal contribuant à la tension corticale, qui servirait également de senseur mécanique de la matrice extracellulaire (Chugh et Paluch 2018). En effet, le glissement des fibres d'actine est dirigé par les filaments de myosine II, le complexe ainsi formé est qualifié d'actomyosine.

Les fibres d'actine du cortex sont reliées à la membrane par une famille de protéines appelée ERM (ezrine, radixine et moésine) grâce à leur liaison avec les phosphoinositides PI(4,5)P₂. Ce lipide membranaire promeut également la formation de filaments d'actine, en activant ou inhibant certains ABPs (Saarikangas *et al.* 2010). Ces dernières peuvent être détournées par les bactéries pathogènes pour faciliter leur entrée dans la cellule. Ainsi elles manipulent, *via* leurs effecteurs, la famille de protéines Rho GTPases impliquées dans la régulation des ABPs (Ham *et al.* 2011).

II. Les vésicules géantes unilamellaires

L'étude directe de la membrane plasmique, du fait de sa dynamique et de sa complexité, constitue un véritable challenge. En s'inspirant du vivant et de la capacité des phospholipides à s'auto-assembler en bicouche en milieu aqueux, plusieurs modèles biomimétiques ont vu le jour et représentent aujourd'hui des outils indispensables pour comprendre le fonctionnement et les propriétés de la membrane plasmique. Ils ont pour structure de base la bicouche lipidique et miment ainsi l'agencement des phospholipides dans la membrane plasmique, mais peuvent être plus complexes en intégrant des protéines. Ces modèles, créés ou adaptés en fonction de l'objet d'étude, permettent un contrôle sur la composition lipidique, son environnement et les propriétés physico-chimiques de la membrane qui en découlent. Les modèles membranaires biomimétiques peuvent prendre plusieurs formes : les liposomes, les monocouches, les bicouches planes supportées ou couplées à un support. Les liposomes représentent les modèles les plus simples et faciles à former. Ils ont été décrits par Alec Bangham en 1964, qui observa par microscopie électronique des structures d'ovolécythine formant des lamelles concentriques (Bangham et Horne 1964). Les liposomes peuvent posséder une ou plusieurs bicouches lipidiques et sont qualifiés respectivement d'unilamellaires ou de multilamellaires. Les liposomes unilamellaires se catégorisent selon leur diamètre : les petites vésicules (SUV pour *Small Unilamellar Vesicle*) possèdent un diamètre inférieur à 100 nm, les vésicules larges (LUV pour *Large Unilamellar Vesicle*) compris entre 100 nm et 1 µm, puis les vésicules géantes (GUV pour *Giant Unilamellar Vesicle*) au-delà de 1 µm. Quant aux liposomes multivésiculaires, ce sont des liposomes unilamellaires contenant d'autres liposomes unilamellaires plus petits (Figure 11).

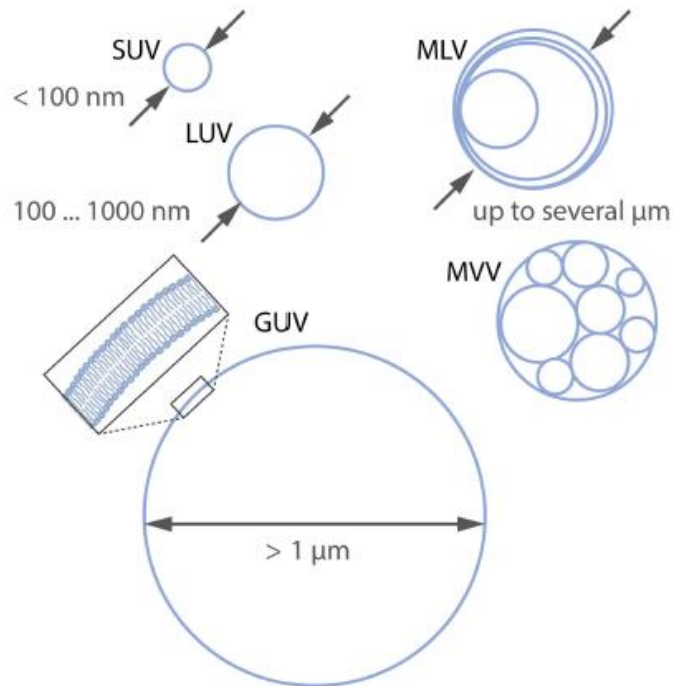


Figure 11 : Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité. SUV : Small Unilamellar Vesicle, LUV : Large Unilamellar Vesicle, GUV : Giant Unilamellar Vesicle, MLV : Multilamellar vesicle et MVV : Multivesicular vesicle (Stein et al. 2017)

Les GUVs sont les modèles biomimétiques possédant les caractéristiques les plus proches des cellules au niveau de leur forme, de leur taille et de la courbure de la bicouche. Au-delà de leur taille, ces liposomes demeurent hors-norme de par la multitude de techniques pour les obtenir, que par la diversité des études les incluant.

1. Les méthodes d'obtention des GUVs

Les techniques pour former les GUVs sont basées sur les propriétés amphiphiles des phospholipides qui permettent la minimisation des interactions entre les chaînes hydrophobes et l'eau. Elles conduisent à l'auto-agencement des chaînes hydrophobes pour former un cœur hydrophobe, entouré des têtes polaires tournées vers le milieu aqueux. Historiquement, les premières GUVs ont été préparées par la technique d'hydratation douce introduite par J.P. Reeves et R.M. Dowben en 1969 (Reeves et Dowben 1969). L'efficacité de cette méthode a été améliorée au fil des décennies donnant naissance à deux nouvelles techniques : l'électroformation et l'hydratation douce assistée par gel. Il existe également un grand panel de techniques reposant sur les émulsions, qui a donné lieu au développement de systèmes microfluidiques. Les techniques basées sur l'hydratation et sur les émulsions vont être détaillées ci-dessous. Pour autant, ils existent d'autres techniques singulières (Tanasescu *et al.* 2018).

1.1. Hydratation douce

L'hydratation douce fut la première technique utilisée pour la formation des GUVs (Reeves et Dowben 1969). Son principe repose sur le gonflement par hydratation de bicouches lipidiques successives, préalablement déposées sur une surface solide, lesquelles vont chacune à tour de rôle se détacher du support pour former une vésicule (Figure 12A).

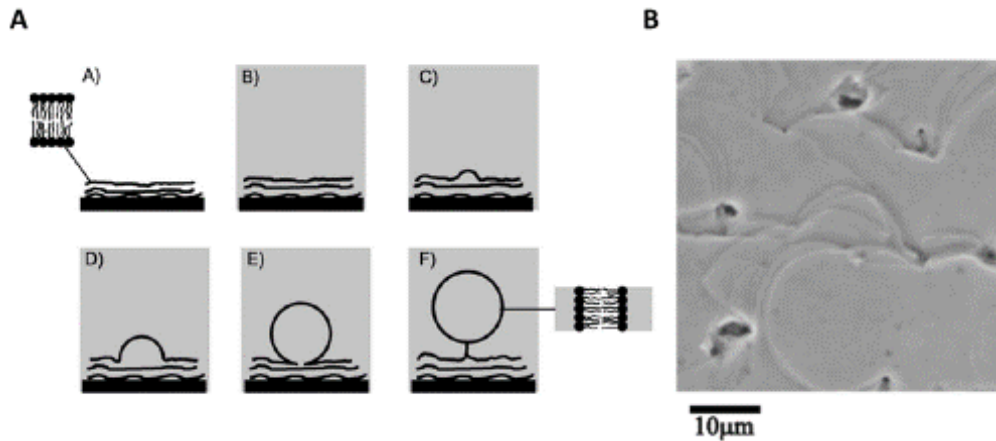


Figure 12 : Principe de la formation de vésicules géantes par hydratation d'un film de bicouches lipidiques. (A) Étapes de ce principe, A : Préparation d'un film de lipide, B : Hydratation du film et gonflement des lamelles lipidiques et C-F : Décollement des lamelles de lipides formant ainsi une vésicule. (B) Image microscopique en contraste de phase d'un film de DOPC, montrant la morphologie d'une succession de plateaux (Hishida et al. 2005; Walde et al. 2010)

Lorsque la solution lipidique est déposée sur une surface solide, un empilement de plusieurs bicouches de lipides se créent à la surface et se caractérise visuellement par une succession de lamelles (Hishida *et al.* 2005) (Figure 12B). Lors de l'hydratation, la pénétration de l'eau entre les lamelles entraîne une augmentation de l'inter-espace entre bicouches à une dizaine d'Å (Figure 12A-B). Cette augmentation du volume d'eau est à l'origine de fluctuations thermiques sur les lamelles lipidiques, qui entraînent des gênes stériques entre celles-ci, et ainsi leur décollement pour former des GUVs (Figure 12A : C-F). Cette dernière étape ne se produit pas lorsque la température de travail se situe en dessous de la T_m des lipides. Autrement dit lorsque les lipides sont agencés en phase gel, aucune GUV ne peut alors se former (Hishida *et al.* 2008).

La répulsion entre lamelles, indispensable pour la formation des GUVs, est plus difficile pour des lipides neutres ou zwitterioniques, tels que les PC ou PE. Cependant, elle peut être améliorée de différentes manières. La présence de cations divalents ou l'incorporation de lipides chargés contribuent à créer une répulsion électrostatique des lamelles (Akashi *et al.* 1998; Akashi *et al.* 1996). Dans des milieux contenant moins de 100 mM en KCl, l'incorporation de lipides chargés est nécessaire pour obtenir un nombre conséquent de GUVs (Akashi *et al.* 1996). La

création d'un encombrement stérique entre les bicouches lipidiques, notamment par la présence de PEG, facilite le détachement des bicouches entre elles (Yamashita *et al.* 2002). De même, la pression osmotique induite par l'ajout de sucres dans le tampon de travail améliore la répulsion entre les lamelles lipidiques (Tsumoto *et al.* 2009).

L'hydratation douce est le moyen le plus simple d'obtenir des GUVs, mais c'est un processus lent qui nécessite des temps de l'ordre de la journée. De plus, cette technique conduit à la formation d'un nombre non négligeable de liposomes multilamellaires (Rodriguez *et al.* 2005), même si toute agitation est exclue au risque d'amplifier leur formation (Bangham et Horne 1964). Pour ces raisons, cette méthode est peu utilisée à l'heure actuelle. Néanmoins l'hydratation douce demeure la base de plusieurs techniques ayant réussi à améliorer le décollement des lamelles entre elles, sans modifier le milieu d'hydratation ou le mélange lipidique. En utilisant un rayonnement infrarouge localisé à l'aide d'une fibre optique, des GUVs peuvent être produites en quelques minutes même en phase gel, la température locale atteignant 80-90°C (Billerit *et al.* 2012). De même, la fréquence d'ondes mécaniques permet d'obtenir des rendements identiques et des temps similaires à l'électroformation (Pavlič *et al.* 2011). Cette dernière technique, ainsi que l'hydratation assistée par gel, constituent des techniques à part entière nécessitant une maîtrise spécifique.

1.2. Electroformation

Conçue par M.I. Angelova et D.S. Dimitrov en 1986, l'électroformation s'appuie sur l'application d'un courant électrique qui permet d'obtenir des GUVs en quelques heures seulement, l'électro-osmose étant supposée en être la force motrice (Angelova et Dimitrov 1986). Typiquement, un courant électrique alternatif est appliqué à travers une chambre remplie de la solution de réhydratation, contenant les surfaces conductrices avec les lipides. En général, les lipides sont déposés sur des lames de verre revêtues d'oxyde d'indium-étain ou sur des fils de platine (Figure 13). La formation du film lipidique est une étape cruciale pour obtenir une bonne reproductibilité dans la taille des liposomes. Pourtant, les défauts d'étalement permettraient un meilleur influx de l'hydratation (Stein *et al.* 2017).

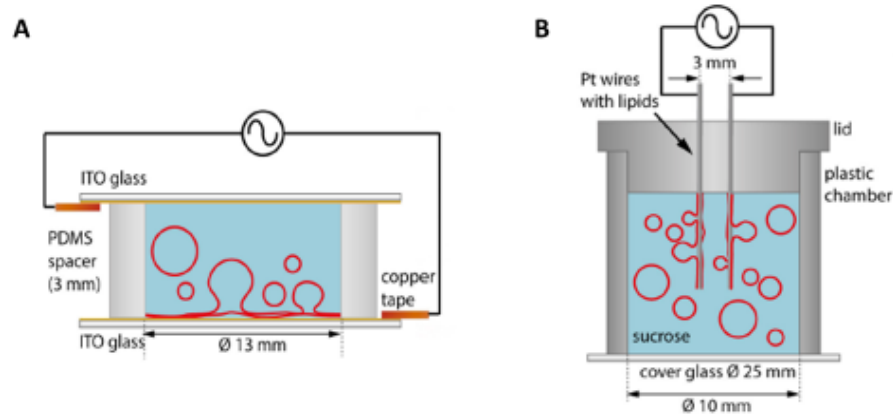


Figure 13 : *Illustration schématique de chambres d'électroformation, utilisant (A) des lames de verre revêtues d'oxyde d'indium-étain ou (B) des fils de platines, les lipides étant représentés en rouge (Stein et al. 2017).*

La méthodologie de mise en œuvre comporte généralement 3 étapes (Méléard *et al.* 2009) :

- Initiation du décollement : l'amplitude électrique suit une rampe jusqu'à une amplitude maximale et ce à une fréquence fixe, l'amplitude doit être suffisamment forte pour garder la forme sphérique
- Croissance des GUVs (Figure 14) : l'amplitude et la fréquence restent constantes jusqu'à obtention de la taille souhaitée, cette étape n'est pas toujours nécessaire si la première étape est suffisamment longue
- Détachement et libération des GUVs : la fréquence est réduite pour permettre la fermeture des vésicules et leur détachement

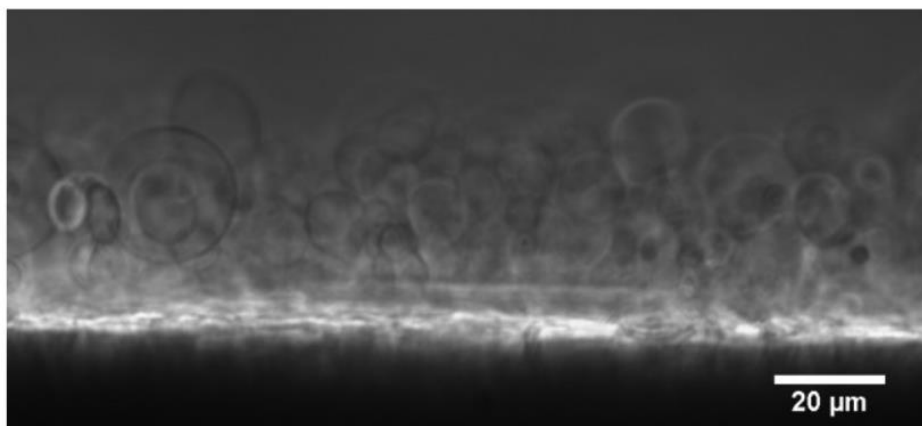


Figure 14 : *Images de GUVs pendant leur électroformation sur fil de platine (Garten et al. 2015)*

Les paramètres de l'électroformation : la durée, la fréquence et le champ électrique sont optimisés empiriquement. Une fréquence du champ électrique plus grande est nécessaire pour l'électroformation en milieu physiologique, afin de passer outre l'écran provoqué par la salinité

du milieu (Montes *et al.* 2007; Pott *et al.* 2008). La formation par électroformation de protéoliposomes, dont la bicouche lipidique intègre une ou des protéines membranaires, a été pendant très longtemps limitée, à cause de la présence de solvants organiques dans le dépôt des lipides qui dénature les protéines. Cet obstacle fut finalement contourné en déposant des suspensions aqueuses partiellement desséchées de SUVs ou LUVs, ouvrant ainsi la voie à la formation des premiers protéoliposomes par électroformation (Girard *et al.* 2004). Depuis les premières incorporations de bactériorhodopsines, de nombreuses autres protéines transmembranaires ont pu également être insérées par cette technique (Rideau *et al.* 2019).

Même si l'électroformation reste la méthode la plus populaire, elle présente également certains inconvénients. En particulier, il n'est pas possible d'incorporer une grande quantité de lipides chargés (Rodriguez *et al.* 2005). D'autre part, l'application de protocoles d'électroformation, même standards, peut générer une catalyse de l'oxydation des lipides, en particulier des lipides polyinsaturés (Y. Zhou *et al.* 2007). La durée et le champ électrique sont des paramètres pouvant être à l'origine de ce phénomène (Breton *et al.* 2015). En revanche, il n'est pas connu si l'oxydation est provoquée directement par le courant alternatif, ou indirectement par élévation de la température. Les lipides oxydés entraînent des artefacts sur les propriétés membranaires et notamment sur la séparation de phases (Ayuyan et Cohen 2006). L'utilisation d'un support non-conducteur pour le dépôt des lipides, positionné entre les électrodes, a été proposée comme alternative pour diminuer le risque d'oxydation (Y. Okumura *et al.* 2007).

1.3. Hydratation assistée par gel

Datant d'une dizaine d'années seulement, la technique d'hydratation assistée par gel offre de nombreux avantages, notamment une simplicité au niveau du matériel, très peu de limitations par rapport aux lipides et aux tampons utilisés, ainsi que des temps d'obtention très rapides. Sa particularité est la présence d'un gel de polymère poreux sous les lipides, qui augmente la surface d'hydratation et facilite le réarrangement des bicouches en vésicules. Pour former cette couche de gel, le polymère est dissous à chaud en milieu aqueux puis déposé sur une surface de verre. Une fois la couche de polymère séchée par chauffage de la surface, une solution lipidique y est étalée puis, le solvant organique de cette solution évaporé. Une chambre d'hydratation est alors créée, notamment sous la forme d'un puits, pour permettre la production des GUVs seulement quelques dizaines de minutes après l'ajout de la solution d'hydratation.

La technique d'hydratation assistée par gel a été mise en œuvre la toute première fois avec un gel d'agarose pour obtenir des GUVs en conditions physiologiques, ainsi qu'avec des mélanges de lipides chargés tels que le DOPS et le POPG (Horger *et al.* 2009). La force ionique, favorisant la coalescence des vésicules pendant leur formation, permet d'obtenir des GUVs de diamètre plus important et en plus grand nombre (Peruzzi *et al.* 2016). Malheureusement la couche d'agarose n'étant pas imperméable, elle forme une couche hydride avec les lipides. Par conséquent lorsque les bicouches lipidiques se détachent, elles encapsulent une partie de l'agarose lors de la formation des vésicules, ce qui modifie leurs propriétés mécaniques et augmente leur perméabilité (Lira *et al.* 2014). Par la suite un autre polymère, l'alcool polyvinylique (PVA, pour *Polyvinilic Alcohol*), a permis d'obtenir la même efficacité de production qu'avec l'agarose sans s'intégrer aux GUVs formées, évitant ainsi toute contamination (Weinberger *et al.* 2013).

Néanmoins, une récente étude a mis en évidence une différence des propriétés mécaniques entre des GUVs préparées par électroformation et celles préparées par hydratation assistée par PVA. En parallèle, la présence de PVA dans le milieu d'hydratation a été détectée, ce qui serait à l'origine notamment d'une réduction du coefficient de diffusion, et d'une perte d'élasticité lors de l'étirement de la membrane (Dao *et al.* 2017). En définitive, la contamination des GUVs par le polymère s'avère être le défaut majeur de cette technique.

Par conséquent, une nouvelle génération de gels de polymère émerge actuellement, cette fois-ci les gels sont liés de manière covalente au support pour éviter leur dissolution dans le milieu (López Mora *et al.* 2014; Movsesian *et al.* 2018). De plus, leurs caractéristiques structurales deviennent un enjeu pour contrôler le diamètre des vésicules avec le minimum de polydispersité (Figure 15). Par exemple, la sélection de la densité de réticulation sur un hydrogel de dextran(éthylène glycol) (DexPEG) permet de cibler spécifiquement un ordre de grandeur de taille des GUVs (López Mora *et al.* 2014). D'autre part, leurs propriétés physico-chimiques ont un impact direct sur le rendement d'obtention des GUVs. En diminuant les interactions attractives entre l'hydrogel et les bicouches lipidiques, il est possible d'augmenter la quantité de liposomes obtenus (Mora *et al.* 2017; Movsesian *et al.* 2018).

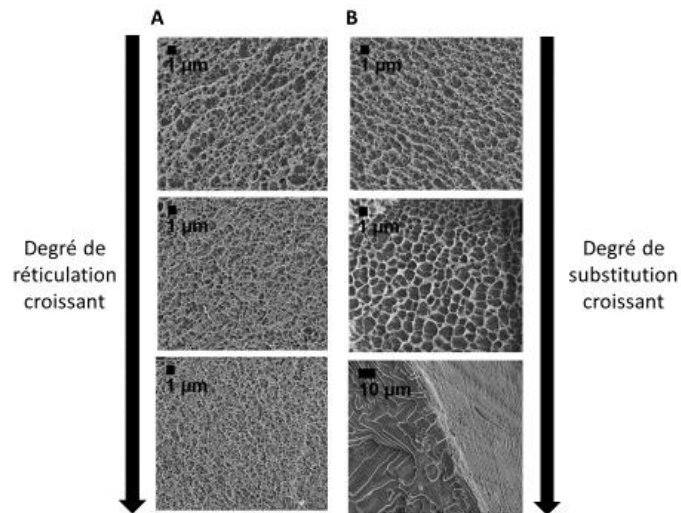


Figure 15 : Modulation de la microstructure de l'hydrogel DexPEG par variation (A) du degré de réticulation du monomère PEG ou (B) du degré de substitution du monomère Dex (Adaptée de Mora et al. 2017)

Deux méthodes ont été utilisées à ce jour pour former des protéoliposomes par hydratation assistée par gel. Le premier exemple repose sur l'ajout de protéines transmembranaires : les aquaporines et des récepteurs à la sérotonine, dans l'agarose fondu (Gutierrez et Malmstadt 2014; Hansen *et al.* 2013). Puis de manière similaire à l'électroformation, l'incorporation de glycoprotéines P, impliquées dans le transport transmembranaire de manière dépendante à l'ATP, a été réalisée à partir de petits protéoliposomes déposés et séchés sur de l'agarose (Horger *et al.* 2015).

1.4. Méthodes à base d'émulsion et leur développement en systèmes microfluidiques

Les GUVs peuvent également être obtenues par une diversité de techniques reposant sur l'utilisation d'émulsions simples ou parfois multiples. Sachant que les phospholipides se placent à l'interface entre un milieu aqueux et un milieu huileux de par leur propriété amphiphile, le maniement de ces milieux multiphasiques permet de les orienter, de les déplacer et finalement de les réunir pour former des vésicules géantes. Dans la plupart des cas, ces méthodes sont adaptées pour être utilisées en microfluidique. La microfluidique est, en effet, basée sur la création de plateformes miniaturisées impliquant des micro-puces ou des capillaires fins pour manipuler des volumes de fluide très petits (Yusuke Sato et Takinoue 2019). Par la suite, les principales méthodes basées sur les émulsions vont être présentées, à savoir :

- le transfert d'émulsion,
- la double émulsion,

- la propulsion sur bicouche plane.

Une première méthode, appelée transfert d'émulsion E/H, consiste à préparer d'un côté une émulsion E/H (Eau dans Huile) stabilisée par une monocouche de phospholipides, présentant leurs chaînes grasses vers l'extérieur. D'un autre côté, un système biphasique d'eau et d'huile est préparé, dont l'interface est saturée en phospholipides. L'huile étant plus légère que l'eau, la monocouche expose les queues hydrophobes des lipides vers le haut. Par conséquent, lorsque l'émulsion E/H est versée sur le système biphasique et traverse l'interface par gravité, les deux monocouches se réunissent pour ne former plus qu'une seule et même bicouche, sachant que les GUVs ont la taille de l'émulsion formée au préalable (Figure 16A) (Pautot *et al.* 2003a). Un des grands avantages de cette technique est que les monocouches peuvent être de composition différente, pour créer des GUVs dont la bicouche lipidique est asymétrique (Pautot *et al.* 2003b). Par la suite, cette méthode a été déclinée dans des systèmes microfluidiques, notamment en un système horizontal triphasique composé respectivement de l'intérieur vers l'extérieur de strates : de décane, d'une huile de densité intermédiaire comportant les lipides en suspension et à l'interface avec la dernière phase aqueuse (Figure 16B). Une goutte d'eau est injectée par capillaire dans la première phase de décane et est transférée par force centrifuge à l'extrémité du système, où les GUVs sont récupérées (Abkarian *et al.* 2011). En outre, les systèmes microfluidiques peuvent intégrer des compartiments conçus pour piéger et isoler un à un des objets de tailles micrométriques, comme les GUVs. Habituellement, ils permettent de réaliser des études à l'échelle individuelle, dites *single cell*. De manière originale, ce piégeage a été utilisée pour assembler des liposomes géants couche par couche, de composition identique ou différente (Figure 16C). Après la capture d'une émulsion E/H stabilisée par des phospholipides, celle-ci est exposée à une alternance d'huile contenant les phospholipides de la couche suivante et d'eau pour provoquer le réarrangement en bicouche des phospholipides fraîchement apportés, jusqu'à atteindre le nombre de couches souhaité (Matosevic et Paegel 2013).

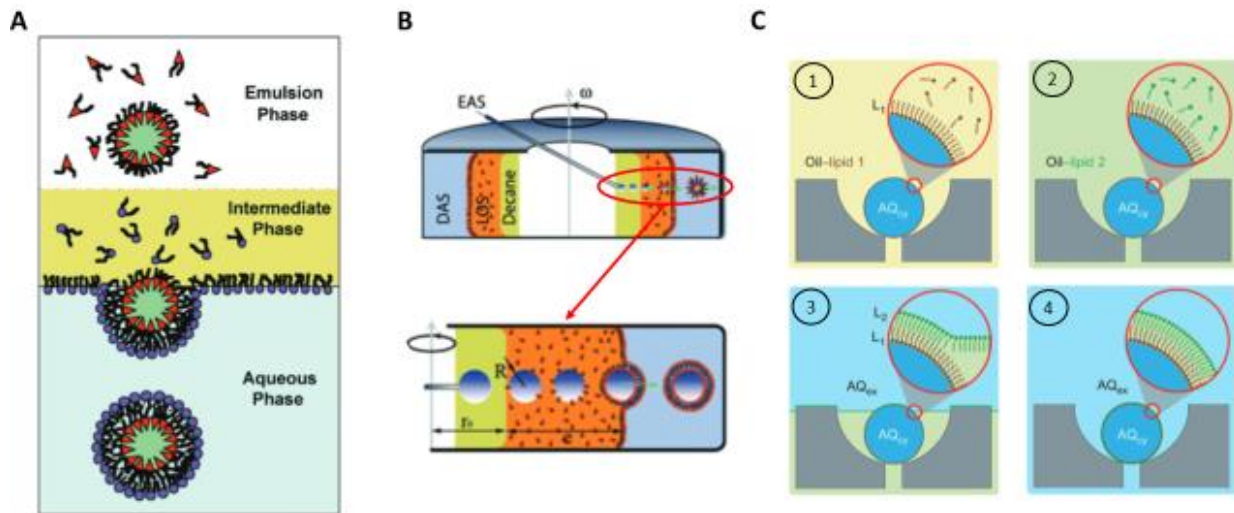


Figure 16 : **Méthode de transfert d'émulsion E/H.** (A) Principe de la méthode de transfert d'émulsion E/H (Pautot et al. 2003b), (B) adapté en système microfluidique pour la production à haut débit de GUVs par force centrifuge à une vitesse de rotation angulaire ω , où EAS signifie : Encapsulated aqueous solution, LOS : Lipid-in-oil solution et DAS : Dispersing aqueous solution (Abkarian et al. 2011). (C) Assemblage couche par couche d'une émulsion E/H capturée dans un système microfluidique alternant entre huile contenant les lipides et eau pour l'assemblage des lipides (Matosevic et Paegel 2013).

La méthode de double émulsion repose, elle, sur la combinaison d'un solvant non miscible avec l'eau comportant les phospholipides et d'une phase aqueuse, cette dernière étant la future solution interne des vésicules. Ce flux est ensuite dirigé vers un milieu aqueux final conduisant à la formation d'une émulsion E/H/E (Eau dans Huile dans Eau) grâce au positionnement des lipides aux 2 interfaces qui, lors de l'élimination du solvant, se rejoignent pour former une bicouche (Figure 17A) (Shum *et al.* 2008). L'inconvénient de cette méthode, et de manière générale des techniques basées sur les émulsions, reste la présence résiduelle d'huile ou de solvant à l'intérieur des bicouches. Cette contamination impacte les propriétés mécaniques des GUVs et empêche notamment la séparation de phases. Des procédés plus propres ont donc été développés. Une première piste a été de modifier les systèmes microfluidiques, pour tirer parti de l'affinité des solvants pour les capillaires, ce qui permet d'obtenir une couche plus fine de solvant emprisonné (Figure 17B). Dans ce nouveau système, une combinaison de deux solvants a été choisie, le chloroforme pour sa facilité à s'évaporer et l'hexane, un solvant non adapté pour la solubilisation des lipides. Tandis que le chloroforme s'évapore spontanément, les monocouches se rassemblent et chassent l'hexane dans une petite poche hydrophobe, qui une fois évaporée donne lieu à des GUVs suffisamment propres, pour présenter des séparations de phases (Arriaga *et al.* 2014). Une autre étude, quant à elle, a remplacé cette combinaison de solvants organiques par du 1-octanol, car ce dernier s'élimine naturellement de la double émulsion (Figure 17C) (Deshpande *et al.* 2016; Deshpande et Dekker 2018). Sur le même principe,

le transfert d'une émulsion E/H préparée avec de l'acide oléique dans un mélange éthanol/eau entraîne la dissolution de l'acide oléique dans l'éthanol, forçant les lipides restants à s'organiser sur la monocouche pour former des GUVs (Y.-C. Tan *et al.* 2006).

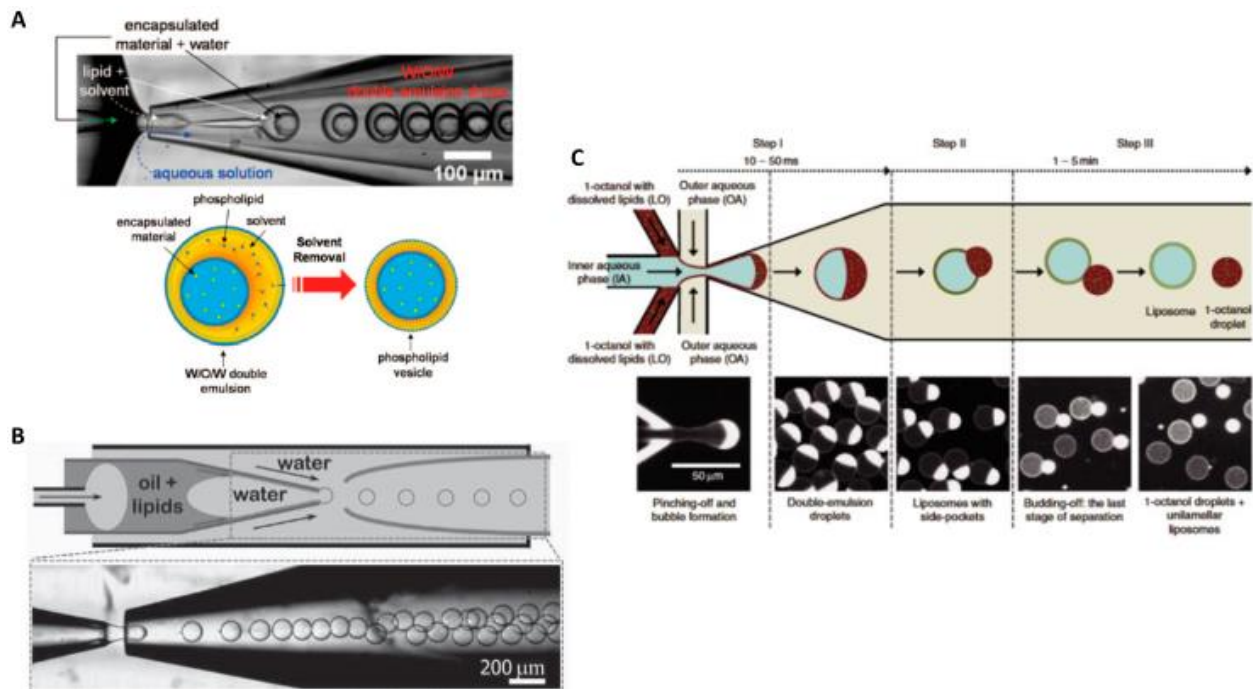


Figure 17 : Méthode de la double émulsion en microfluidique. (A) Formation d'une émulsion E/H/E, puis évolution schématique vers les GUVs après élimination de l'huile (Shum *et al.* 2008). (B) Réduction de la proportion d'huile dans l'émulsion E/H/E par modification du système microfluidique (Arriaga *et al.* 2014). (C) Utilisation de l'octanol comme huile pour la production de GUVs plus propres (Deshpande *et al.* 2016).

Pour finir, la méthode de propulsion consiste à déformer une bicouche plane pouvant être asymétrique pour obtenir une vésicule. Un jet pulsé d'eau à une pression 60 kPa est envoyé sur une bicouche plane, dont la déformation va entraîner la fermeture de la vésicule (Figure 18A) (Funakoshi *et al.* 2007). Pour produire une grande quantité de GUVs (une centaine par minute), des bicouches planes sont formées à des jonctions T entre une piste centrale et de nombreuses chambres annexes situées sous celle-ci. Des bulles générées par un laser infrarouge provoquent un mouvement de fluide dans chaque chambre vers la piste centrale emportant la bicouche au passage. Les forces de cisaillement générées par le flux et les obstacles de la piste central vont alors conduire à la formation d'une vésicule (Figure 18B) (Ota *et al.* 2009). Pour réduire la présence d'huile résiduelle, une étude utilise de manière élégante l'instabilité de Plateau-Rayleigh. Ce phénomène est visible lors de l'écoulement au goutte à goutte d'un robinet d'eau. En effet, les cylindres de fluide sont instables et conduisent à la formation de gouttelettes, pour diminuer leur tension superficielle. Lors de cette étude, le tube de lipides est obtenu par

déformation d'une bicouche à l'aide d'une buse. Puis l'instabilité de Plateau-Rayleigh accentuée par une répartition non homogène de l'huile va entraîner la rupture du tube en deux populations de GUVs : de larges GUVs contenant une grande quantité d'huile et de GUVs plus petites avec très peu d'huile (Figure 18C). Ces dernières ont été utilisées pour des études sur la dynamique du flip-flop de PS (Kamiya *et al.* 2016).

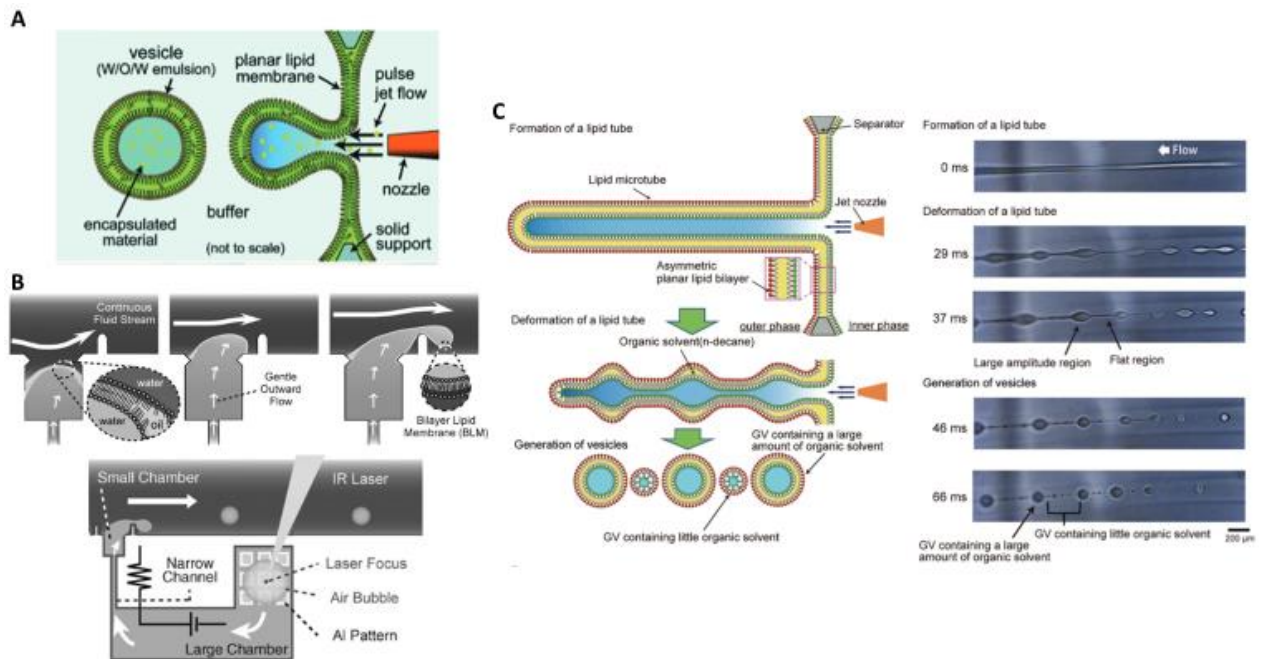


Figure 18 : Méthode de propulsion en système microfluidique. Déformation d'une bicouche lipidique plane, (A) brutale par jet pulsé ou (B) douce par déplacement de fluide, pour provoquer sa fermeture (Funakoshi *et al.* 2007; Ota *et al.* 2009). (C) Formation et déformation d'un nanotube de lipides en GUVs contenant très peu d'huile (Kamiya *et al.* 2016).

Les dispositifs microfluidiques offrent de nombreux avantages : la production de GUVs à haut débit avec des tailles contrôlées, des taux d'encapsulation de molécules d'intérêt élevés et une meilleure accessibilité à la création de membrane asymétrique. Par ailleurs, l'incorporation de protéines est également possible grâce à l'injection de protéoliposomes par pico-injection (Figure 19). Il s'agit d'une injection séquentielle grâce à l'activation d'une électrode, qui déstabilise les surfactants présents à l'interface pour laisser place à l'injection (Abate *et al.* 2010; Weiss *et al.* 2018). Au final, les systèmes microfluidiques nécessitent du matériel sophistiqué, moins accessible en laboratoire. De plus, même si de nombreux efforts ont été réalisés dans certains protocoles pour éliminer complètement les traces de solvant ou d'huile, les surfactants ou polymères utilisés pour contrôler l'écoulement des fluides dans ces systèmes miniaturisés restent des contaminants toujours présents.

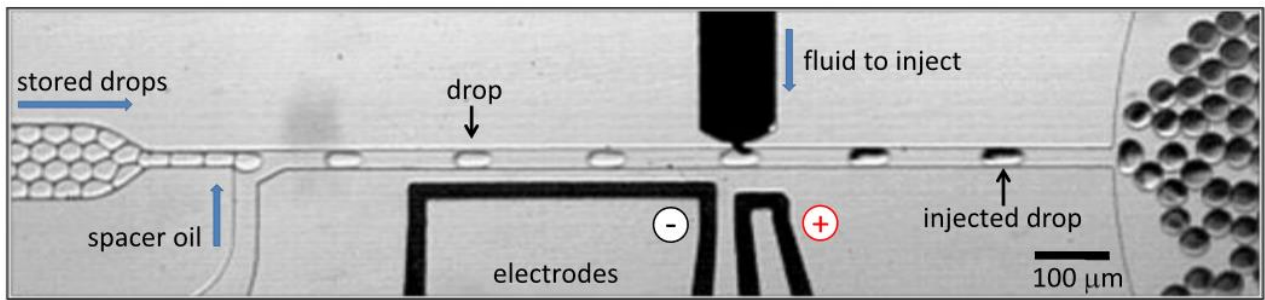


Figure 19 : *Fonctionnement de la pico-injection en système microfluidique* (Abate et al. 2010).

2. Application des GUVs pour étudier la membrane plasmique

2.1. Modèle membranaire biomimétique incontournable

Les GUVs, composées de phospholipides, peuvent être complexifiées en incorporant des protéines membranaires ou en recréant des structures cytosquelettiques à l'intérieur de celles-ci (Mulla *et al.* 2018). De même, des vésicules géantes peuvent être reconstituées à partir d'extraits de membranes cellulaires (Montes *et al.* 2007). Elles exposent ainsi toute la diversité lipidique et protéique de la membrane plasmique, mais ne sont en aucun cas une copie conforme à ce qu'elles étaient avant extraction. Les résultats obtenus avec ces dernières sont souvent plus compliqués à exploiter, notamment à cause de l'absence de contrôle de leur composition. En revanche, cette diversité entraîne des séparations de phases lipidiques, dont les caractéristiques physiques sont plus pertinentes qu'avec des compositions simples, constituées de quelques lipides seulement (I. Levental et Veatch 2016).

Les GUVs sont des plateformes permettant d'étudier les propriétés mécaniques de la membrane, la courbure et les phénomènes de déformation membranaire (fusion, fission, invagination, bourgeonnement, ...) ou encore la séparation des phases lipidiques (Dimova 2019). Même si les phases formées *in vitro* mesurent quelques micromètres contre, putativement, quelques nanomètres sur la membrane plasmique, elles offrent l'avantage d'être visibles par microscopie et donc d'observer les phénomènes de ségrégation protéique. En effet, certaines protéines se localisent préférentiellement en phase désordonnée comme le récepteur à la sérotonine, alors que d'autres comme l'aquaporine résident en phase ordonnée (Figure 20B) (Gutierrez et Malmstadt 2014; Hansen *et al.* 2013). Par ailleurs, la courbure peut également être impliquée dans la séparation protéique. A titre d'exemple, la préférence de la protéine IRSp53 par le biais de son domaine I-BAR pour une courbure négative a été démontrée grâce à la manipulation de GUVs par micropipette. Ce résultat a permis de mieux comprendre le rôle de

cette protéine dans la formation de filopodes, qui sont des extensions fines du cytoplasme impliquées notamment dans la migration cellulaire (Figure 20A) (Prévost *et al.* 2015). De manière plus précise, l'aspiration par micropipette consiste dans un premier temps à immobiliser une GUV, puis d'en extraire un nanotube de lipides, présentant une forte courbure, grâce à la manipulation d'une bille par pinces optiques. Un autre exemple, est l'application des GUVs à la compréhension du mécanisme de clustering des Shiga-toxines sur la membrane, toxines produites entre autres par les souches d'EHEC. En étudiant l'impact de l'augmentation de la tension de surface de la membrane induite par aspiration, il a été prouvé que la tension de ligne, survenant lors de la présence de lipides avec des longueurs différentes de chaîne hydrophobe, n'est pas à l'origine du regroupement des Shiga-toxines entre elles sur la membrane. En réalité, ce sont fluctuations thermiques de la membrane qui guident ce rassemblement (Pezeshkian *et al.* 2017). En plus de l'interaction avec des toxines, protéines ou peptides, l'interaction de la membrane avec des cellules entières, notamment des pathogènes peut directement être étudiée. L'invasion de *Pseudomonas aeruginosa* à l'intérieur d'une GUV en présence de globotriaosylcéramide (Gb3) a été visualisée de manière indépendante à la polymérisation d'actine (Figure 20C). Ce mécanisme d'entrée de type *zipper*, passe par l'induction d'une courbure négative lors de l'interaction entre la lectine galactophilique, protéine située à la surface de la bactérie, et le résidu sucre du Gb3 (Eierhoff *et al.* 2014).

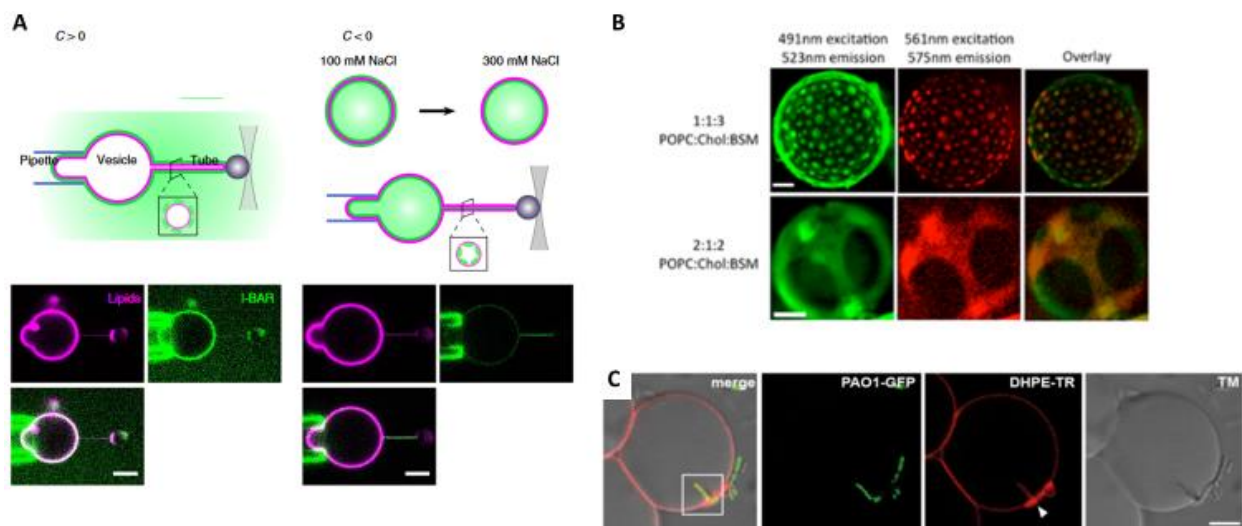


Figure 20 : Utilisation des GUVs comme membrane biomimétique dans un large panel d'études. (A) Présence de la protéine IRSp53 (vert) sur la membrane à l'intérieur du nanotube (violet), démontrant une préférence pour la courbure négative ($C < 0$) (Prévost *et al.* 2015). (B) Co-localisation des domaines liquides désordonnés (vert) et des récepteurs à la sérotonine (rouge) (Gutierrez *et al.* 2014). (C) Entrée de *Pseudomonas aeruginosa* (vert) dans une GUV en présence de Gb3 (rouge) (Eierhoff *et al.* 2014).

2.2. Châssis cellulaire commun pour la biologie de synthèse

La biologie synthétique vise à reproduire des fonctions biologiques, voire concevoir de nouveaux systèmes biologiques. Une des deux approches en biologie synthétique, appelée *bottom-up*, consiste à construire à partir de plusieurs briques élémentaires une cellule artificielle ayant une ou plusieurs fonctions basiques. Dans cette approche, les GUVs constituent une enveloppe privilégiée, la compartimentation étant une des caractéristiques vitales du vivant. En encapsulant un système d'expression de gènes à l'intérieur de GUVs, la molécule fluorescente GFP a pu être produite durant 4 jours, durée limitée par la quantité d'ATP disponible dans le milieu externe, accessible grâce à la présence de pores formés par α -hémolysine (α -HL), produite *in situ* comme la GFP (Noireaux et Libchaber 2004). La génération d'énergie, illustrée par cet exemple, est une fonction indispensable pour la conservation du vivant, au même titre que la division cellulaire, la motilité ou encore l'échange d'informations (Yewdall *et al.* 2018). Récemment des organites synthétiques, composés de deux photoconvertisseurs d'origines différentes et une synthase d'ATP, ont été créés pour apporter l'ATP nécessaire par photosynthèse. Au final, en fonction de la nature de la lumière appliquée, la production de force protonique motrice est plus ou moins facilitée, permettant ainsi de moduler l'apport d'ATP pour la polymérisation de l'actine à l'intérieur de GUVs (Figure 21A) (K. Y. Lee *et al.* 2018).

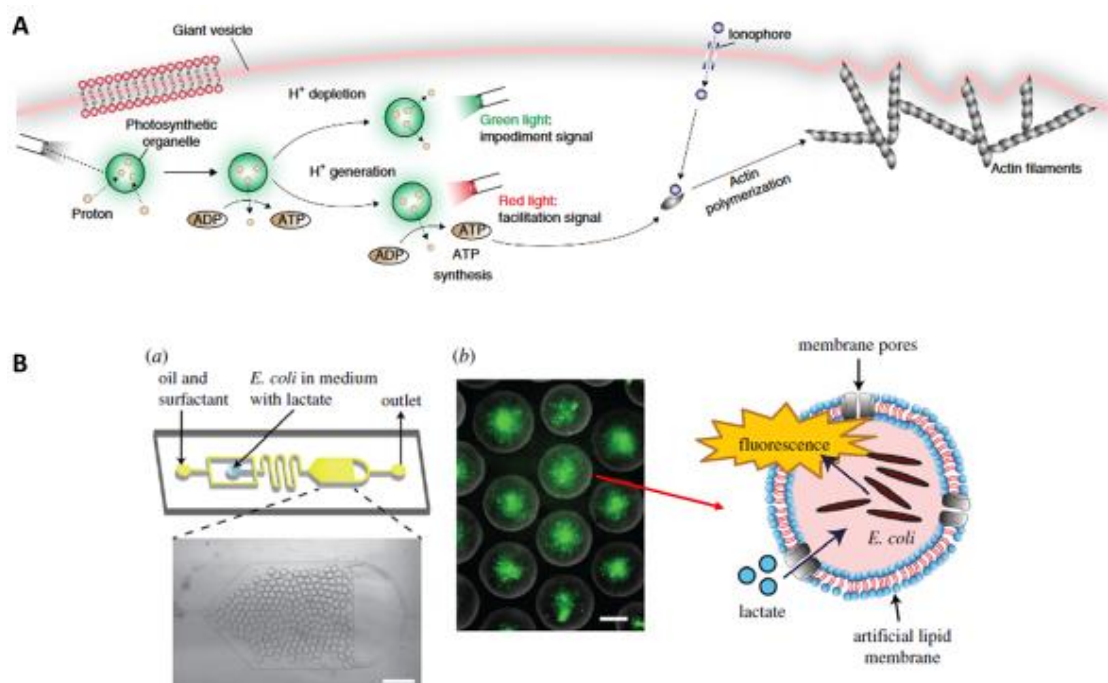


Figure 21 : Les GUVs en biologie synthétique. (A) Polymérisation d'actine à l'intérieur de GUVs grâce à la présence d'organites photosynthétiques producteurs d'ATP (K. Y. Lee *et al.* 2018). (B) Biocapteur de lactate : (a) Système microfluidique pour l'encapsulation dans les GUVs d'*E. coli* modifiée de manière à créer de la fluorescence en présence de lactate (b) Récapitulatif du fonctionnement du biocapteur (Trantidou *et al.* 2018)

Ces constructions permettent de mieux comprendre le fonctionnement du vivant, néanmoins elles répondent également à des besoins industriels, en particulier des applications de biocapteur. Un biocapteur de lactate a été créé en encapsulant des *E. coli* modifiées, de manière à exprimer de la GFP en présence de lactate, dans des GUVs (Figure 21B). De cette façon, les cellules sont isolées du milieu extérieur permettant d'optimiser plus facilement les conditions *in situ*. L'accès au lactate à l'intérieur des GUVs se fait grâce à des pores formés par α -HL. Au final, l'encapsulation de cellules permet d'obtenir une réponse linéaire à une concentration 12 fois plus élevée, en comparaison à l'enzyme seule dans les GUVs (Trantidou *et al.* 2018). Ce travail démontre la difficulté de reproduire avec la même efficacité une fonction biologique, juste en assemblant plusieurs éléments non vivants. La synergie entre l'approche du *bottom-up* et cette deuxième approche en biologie synthétique, appelée *top-down* consistant à utiliser des systèmes biologiques modifiés et simplifiés, multiplie ainsi la capacité des fonctions biologiques créées.

III. L'adhésion bactérienne, un processus clé de la virulence des pathogènes

L'adhésion est l'une des premières étapes dans le processus d'infection de l'hôte. Il s'agit d'un pré-requis pour déployer d'autres facteurs de virulence, impliqués aussi bien dans la colonisation, que dans l'invasion bactérienne (Stones et Krachler 2016). En particulier, une adhésion suffisamment forte est nécessaire pour activer la translocation d'effecteurs dans la cellule hôte, par le biais de l'appareil de sécrétion de type III (T3SS) (Schlumberger *et al.* 2005). Une rupture précoce de cet attachement peut compromettre l'efficacité des effecteurs, car ceux-ci sont injectés dans un ordre bien précis (Winnen *et al.* 2008). D'autant plus que certaines toxines participent au renforcement du contact hôte/pathogène, en déclenchant la présentation d'autres récepteurs sur la surface de l'hôte (X. Wang *et al.* 2012). Pour prévenir l'adhésion de bactéries pathogènes, l'organisme en plus de son système immunitaire dispose de divers mécanismes, tels que le débit d'urine dans les voies urinaires, ou encore l'élimination de la couche supérieure du mucus des cellules épithéliales (Asadi *et al.* 2019). De leur côté, les bactéries possèdent un arsenal d'adhésines diversifiées, leur permettant aussi bien d'approcher une surface éloignée, que de sceller durablement un contact.

1. Les adhésines

Les adhésines sont des macromolécules impliquées dans l'adhésion, allant de la simple protéine à des organites à part entière, monomériques ou polymériques (Kline *et al.* 2009).

1.1. Pili « chaperone-usher »

Les pili « chaperone-usher » (CU) sont les pili les mieux caractérisés et sont exclusivement répandus chez les bactéries Gram-négatif (Zav'yalov *et al.* 2010). Leur implication dans les infections des voies urinaires par UPEC a été très étudiée (McLellan et Hunstad 2016). En effet, UPEC possède d'une part le P-pilus qui cible les reins, et d'autre part le pilus de type I, présent également chez d'autres bactéries, qui permet l'adhésion au niveau de la vessie (Jorgensen et Seed 2012). Ces pili, modèles de référence pour les pili CU, possèdent une architecture constituée de deux parties : une tige hélicoïdale rigide mesurant 7-8 nm d'épaisseur à la base de la surface, qui se succède par une fibre flexible de 1-2 nm de diamètre, dont l'extrémité est recouverte de l'unique unité d'adhésine (Figure 22). L'adhésine du P-pilus, PapG, se lie aux motifs (1-4)- α -D-galactopyranoside des globosides, dont les voies urinaires supérieures sont enrichies, donnant lieu au tropisme tissulaire d'UPEC (Leffler et Svanborg-Edén 1981; Källenius *et al.* 1981). Quant à FimH, l'adhésine du pilus de type I, son récepteur est le mannose. En général, les CU pili mesurent entre 1 et 3 μ m, la partie distale chez les P-pili étant plus longue et donc plus flexible, par rapport aux pili de type I. Cependant, tous les pili CU n'ont pas nécessairement une architecture hybride comme leurs pili modèles. En effet, ils peuvent être constitués seulement de la tige hélicoïdale quaternaire rigide ou de la fibre flexible, dans ce dernier cas ils sont qualifiés d'« afimbrial » (Werneburg et Thanassi 2018). En outre, les pili peuvent être homopolymérique et ainsi exposés plusieurs unités d'adhésine, leur permettant d'être polyadhésifs. Pour exemple, parmi les pili Dr/Afa, l'afimbrial pili Afa possède plusieurs fois l'adhésine AfaE ayant elle-même deux sites distincts de liaison, relatifs soit à la protéine membranaire CD55 ou aussi appelé facteur accélérant le déclin (DAF, pour *decay accelerating factor*), soit aux membres de la famille des antigènes carcino-embryonique (CEACAMS) (Servin 2014).

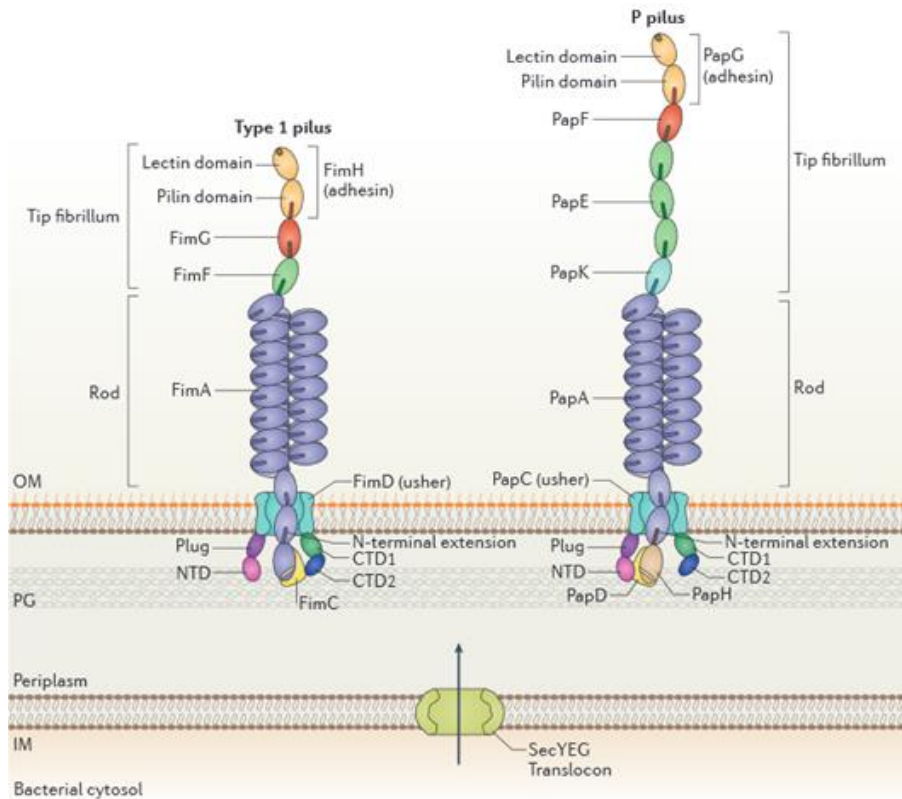


Figure 22 : **Architecture des prototypes des CU pili.** A gauche, le pilus de type 1 et à droite, le P-pilus. OM : outer membrane, PG : peptidoglycan, IM : inner membrane (Hospenthal et al. 2017)

Même s'il existe une hétérogénéité au niveau de leur structure, tous les pili CU possèdent le même mécanisme d'assemblage, donnant lieu à leur nom « chaperonne-usher ». Tout d'abord, les sous-unités du pilus, appelées pilines, traversent la membrane plasmique par le biais du système de sécrétion, en utilisant le translocon SecYEG (Stathopoulos *et al.* 2000). L'adhésine, quant à elle, se décompose en une unité piline et une unité lectine, qui possède une forte affinité pour les sucres. Une fois dans le périplasme, les pilines sont interceptées par une chaperonne, d'une part pour les protéger contre une éventuelle dégradation, et d'autre part pour les transporter jusqu'à un complexe protéique situé sur la membrane externe, appelé *usher*, où a lieu l'assemblage du pilus. Le *usher* possède des domaines périplasmiques : un domaine N-terminal (NTD) et 2 domaines C-terminal (CTDs), mais également une partie transmembranaire formant un pore dans la membrane, qui est obstrué dans un premier temps par une partie appelée *plug*. La liaison du *usher* avec le complexe adhésine-chaperonne déclenche l'assemblage du pilus, en déplaçant le *plug* qui libère l'ouverture du pore. Ce complexe est ensuite transféré du NTD aux CTDs. Puis, le complexe suivant piline-chaperonne interagit avec NTD, puis l'extension N-terminale de la piline se positionne dans la fente hydrophobe occupée par la

chaperonne de l'adhésine, permettant sa libération (Remaut *et al.* 2006). Puis, le complexe piline-chaperonne est transféré aux CTDs et entraîne l'extrusion de l'adhésine vers l'extérieur de la membrane externe. De la même manière, le complexe suivant piline-chaperonne suit ce mécanisme (Hospenthal *et al.* 2017).

1.2. Pili type IV (T4P)

Les pili de type IV sont aussi bien présents chez les bactéries Gram-négatif que positif (Melville et Craig 2013). Il s'agit d'un homodimère, représenté pour *Pseudomonas aeruginosa* par une piline majeure, PilA et de quelques autres pilines à l'extrémité dont l'adhésine, PilY1 (Heiniger *et al.* 2010; Nguyen *et al.* 2015). Contrairement aux pili CU, le pilus de type IV s'assemble au niveau de la membrane plasmique et se désassemble aussi (Wolfgang *et al.* 2000). Ce phénomène est à l'origine de la motilité *twitching*, qui se produit lorsque le pilus s'accroît et se lie à une surface, puis en se rétractant, le pilus entraîne avec lui la bactérie (Gibiansky *et al.* 2010).

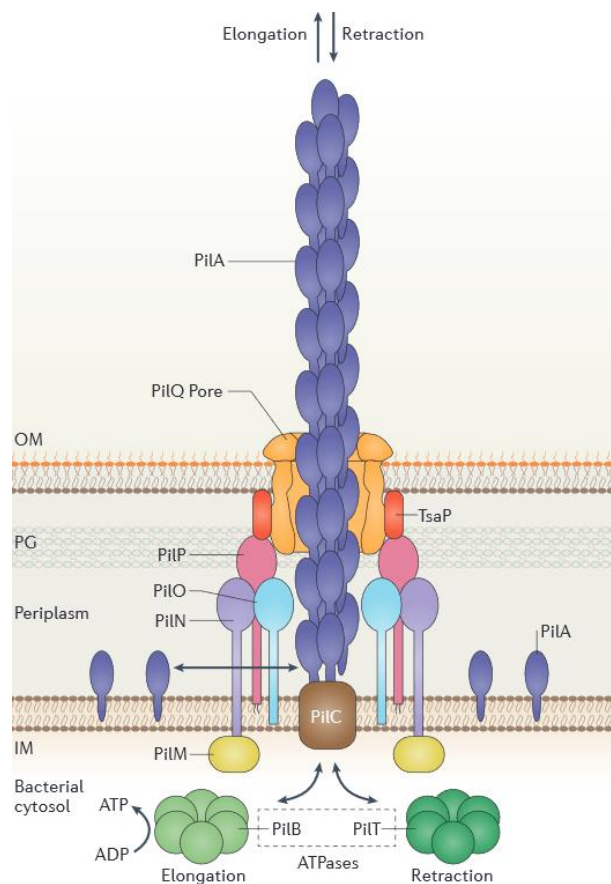


Figure 23 : Architecture du pilus de type IV. OM : outer membrane, PG : peptidoglycan, IM : inner membrane (Craig *et al.* 2019)

Le mécanisme d'assemblage des pili de type IV n'est pas encore complètement élucidé. De manière générale, des pré-pilines sont transférées sur la membrane cytoplasmique par le système de sécrétion, puis la séquence signal en N-terminale exposée dans le cytoplasme, est enlevée par une peptidase, de manière à obtenir des pilines matures avec un N-terminal méthylé. Quant à la machinerie d'assemblage du pilus, elle est constituée d'une ATPase cytoplasmique, l'ATPase d'assemblage ou l'ATPase de désassemblage, et d'un cœur protéique en contact avec l'ATPase et aussi le pilus naissant, par le biais de ses hélices transmembranaires (Figure 23). Lors de l'hydrolyse d'ATP, l'ATPase subit des changements de conformation, qui induisent l'incorporation de pilines au niveau des hélices transmembranaires. Des mécanismes de rotation ou de compression de la plateforme protéique sont actuellement proposés pour expliquer l'assemblage du pili (Craig *et al.* 2019).

1.3. Pili assemblés par sortase

Les pili assemblés par sortase existent exclusivement chez les bactéries Gram-positif et ont la particularité d'avoir les sous-unités reliées entre elles par des liaisons covalentes. Le modèle de biogenèse s'appuie sur celui de *Corynebacterium diphtheriae*, comprenant une phase d'assemblage et une phase d'ancrage (Figure 24). La formation du pilus est orchestrée par des enzymes, appelés sortases, qui clivent au niveau du motif LPXTG du pilus, entre la liaison thréonine-glycine. Les sortases de classe C ou sortases piline peuvent également relier les pilines entre elles par une liaison isopeptide, qui correspond à la liaison amide formée entre l'extrémité précédemment clivée et un résidu lysine sur l'autre piline. La phase d'ancrage, quant à elle, se caractérise par l'attachement covalent de l'assemblage des pilines entre elles sur la paroi cellulaire de la bactérie. Pour cette étape, une sortase de classe A ou *sortage housekeeping* relie le pilus sur la lysine du cross-peptide pentaglycine du lipide II, qui est le précurseur du peptidoglycane (Khare et Narayana 2017). Chez *Corynebacterium diphtheriae*, trois pilines sont présentes : la principale piline SpaA, SpaB présente à la base et de manière intermittente le long du pilus et SpaC située à l'extrémité. Le mécanisme d'assemblage varie d'une espèce à l'autre, par exemple chez *Streptococcus pneumoniae* la piline majeure n'est pas intercalée avec une piline mineure.

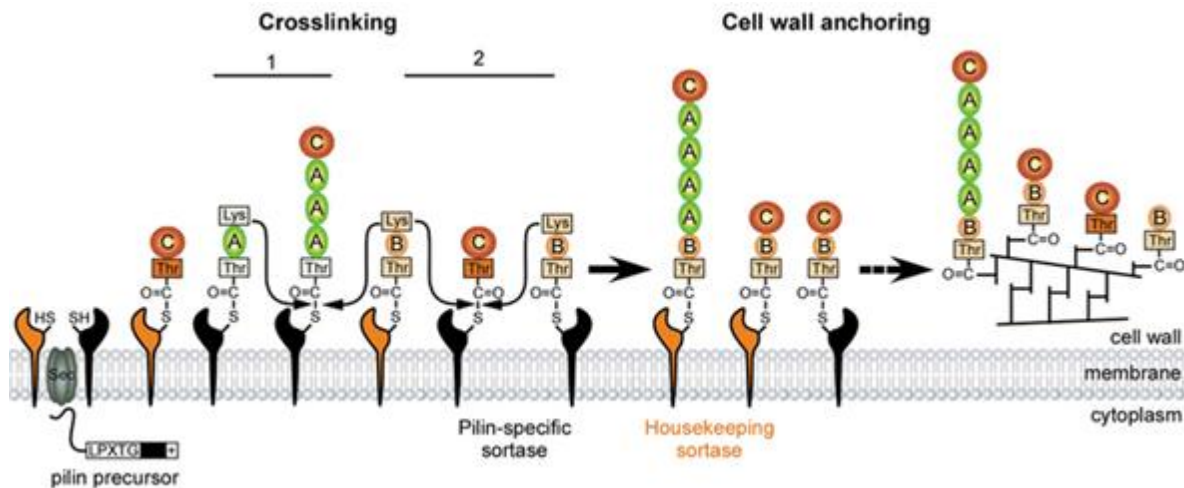


Figure 24 : Assemblage du pilus par sortase chez *Corynebacterium diphtheriae* (Reardon-Robinson et Ton-That 2014)

1.4. Fibres amyloïdes et curli

Les fibres amyloïdes se forment par nucléation de mêmes protéines sur elles-mêmes uniquement lorsque celles-ci sont en état amyloïde, qui correspond à un repliement protéique favorisant les interactions intermoléculaires plutôt qu'intramoléculaires. Ces structures sont toxiques chez les mammifères, où leur production est associée à un mauvais repliement. En revanche chez les bactéries, elles sont fonctionnelles et sont impliquées entre autres, dans l'adhésion et comme élément structural des biofilms (Van Gerven *et al.* 2018). Le curli est la fibre amyloïde la plus étudiée et présente uniquement chez les bactéries Gram-négatif, plus particulièrement chez les entérobactéries et les bactéries environnementales. En utilisant la spectroscopie de force à molécule unique (SMFS, *single molecule force spectroscopy*) par microscopie de force atomique, il a été démontré que le curli et la fibronectine forme de multiples liaisons entraînant une adhésion quasi-irréversible (Oh *et al.* 2016).

Le curli est constitué de deux sous-unités : CsgA majoritaire et CsgB minoritaire (Figure 25). CsgA est tout d'abord amenée dans le périplasme grâce au translocon SecYEG, puis se lie à sa chaperonne CsgE. Pour éviter la formation de fibres amyloïdes dans le périplasme qui est toxique pour la bactérie, CsgF s'associe également avec CsgA. Le complexe CsgA-CsgE est ensuite transporté jusqu'au conduit de translocation formé par CsgG, puis vers le milieu extracellulaire sous sa forme repliée. Comme CsgE et CsgG peuvent former un complexe réversible, il est suggéré que CsgE alterne entre un rôle de chaperonne sous sa forme périplasmique et un rôle dans la translocation lorsqu'elle se lie sur CsgG. A l'extérieur de la bactérie, CsgA a besoin du

nucléateur CsgB pour générer des fibres amyloïdes. Cependant, l'action de CsgB ne peut se faire sans la présence de CsgF, dont le rôle précis n'a pas encore été élucidé. De plus, il n'est pas encore connu à l'heure actuelle si la nucléation a lieu sur la membrane ou sur le curli naissant (Bhoite *et al.* 2019).

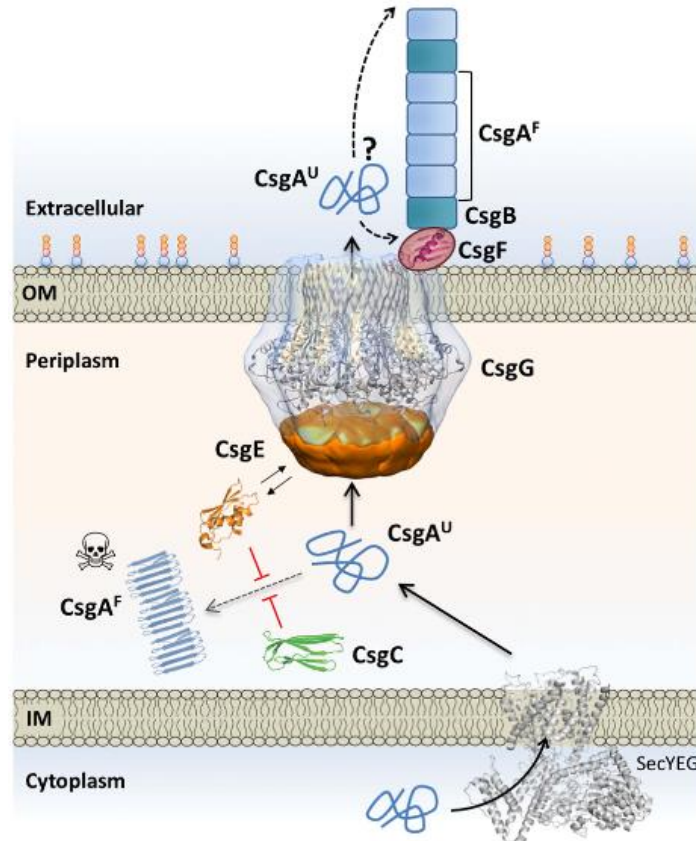


Figure 25 : Mécanisme d'assemblage du curli. OM : outer membrane, IM : inner membrane (Bhoite *et al.* 2019)

1.5. Protéines de la membrane externe

Il existe une multitude de protéines membranaires bactériennes responsables de l'adhésion. Parmi elles, les protéines se lient à la fibronectine, une glycoprotéine retrouvée majoritairement dans la matrice extracellulaire. L'intérêt de cibler la fibronectine est de rentrer en contact indirectement avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$, et par ce biais manipuler l'hôte, notamment pour favoriser l'internalisation par réarrangement du cytosquelette. *Staphylococcus aureus* expose sur sa surface cellulaire des protéines se liant à la fibronectine appelées, FnBPA et FnBPB (Foster 2016; Hymes et Klaenhammer 2016). Celles-ci possèdent entre 10 et 11 domaines de liaison à la fibronectine, en réalité entre 5 et 6 domaines établissent une liaison (Bingham *et al.* 2008). Ces domaines sont désordonnés jusqu'à leur liaison de forte affinité sur la fibronectine,

qui entraîne un changement de conformation en feuillet β anti-parallèle en tandem avec les modules de fibronectine (Meenan *et al.* 2007).

Les lectines sont aussi bien retrouvées comme adhésine des pili, que sous forme soluble comme LecA produite chez *Pseudomonas aeruginosa*. LecA appelée aussi PA-I est un complexe homotétramérique, dont l'une des extrémités par le biais de deux sites adjacents se lie sur la membrane externe de la bactérie, permettant d'exposer les deux autres sites adjacents, situés à l'extrémité opposée du complexe, vers l'environnement extérieur. Elle possède une forte affinité avec Gb3, qui permettrait l'invasion de *Pseudomonas aeruginosa* (Eierhoff *et al.* 2014). Cependant une fois cette liaison établie, d'autres glycolipides contenant en particulier les motifs β -galactose (Gal β) ou N-acetylgalactosamine (GalNAc) se lient sur ce site libre adjacent, par mécanisme de réduction de dimensionnalité (RD, pour *Reduction of Dimensionality*). Même si l'affinité de LecA est faible, cette liaison permet de renforcer l'adhésion (Worstell *et al.* 2018).

Les autotransporteurs, correspondant aux protéines du système de sécrétion de type V, se composent d'un domaine α , appelé passager, qui est transporté au travers de la membrane externe à l'aide d'un domaine tonneau β , inséré dans cette dernière. Ce système ne nécessite aucune source d'énergie pour le transport, d'où le nom d'autotransporteur, cependant certains facteurs restent nécessaires à la sécrétion (Kang'ethe et Bernstein 2013). Les autotransporteurs, qui se divisent en 6 sous-classes, ont des fonctions variables en particulier dans le signal, la virulence et l'adhésion (Figure 26) (Meuskens *et al.* 2019). Un des plus connus est l'intimine, de sous-classe Ve et présent chez EHEC ou *Escherichia coli* entéropathogénique (EPEC). Celui-ci est sécrété lors de l'activation du locus de pathogénicité LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), en même temps que son récepteur Tir (*Translocated Intimin Receptor*), injecté grâce au système de sécrétion de type III dans l'hôte. Une fois présent à sa surface cellulaire, il permet une adhésion de forte affinité avec la bactérie (Battle *et al.* 2014). EtpA, un autotransporteur de sous-classe Vb présent chez *Escherichia coli* entérotoxigénique, est quant à lui sécrété et libéré dans le milieu extracellulaire. De manière surprenante, il guide le flagelle sur les cellules épithéliales du colon, en se liant à son extrémité sur les domaines conservés de la flagelline, la protéine la plus abondante du flagelle (Roy *et al.* 2009). EtpA interagit ensuite avec les mucines transmembranaires MUC3, dont l'accès est rendu possible grâce à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la couche de mucines MUC2 (Luo *et al.* 2014; Kumar *et al.* 2016; 2014).

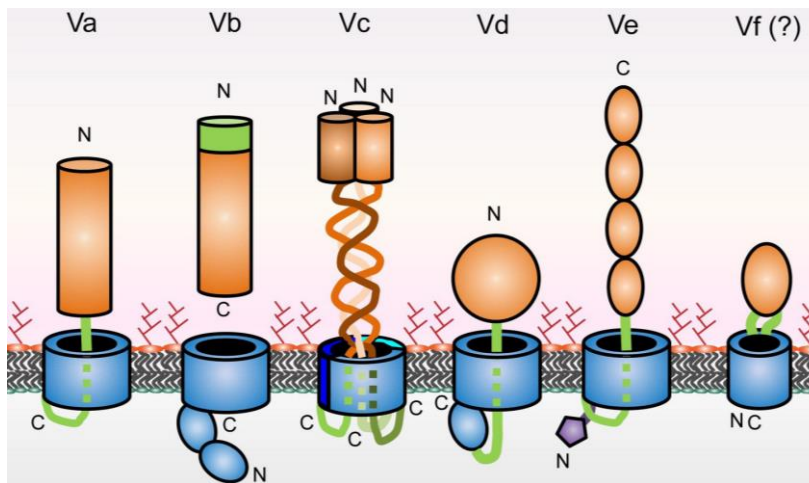


Figure 26 : Schéma des sous-classes du système de sécrétion de type V. Les tonneaux β sont en bleus, les linkers en vert et les passagers en orange. N et C indiquent les positions N- et C-termini (Meuskens et al. 2019)

Une catégorie plus récente de protéines de la membrane externe impliquée dans l'adhésion bactérienne, sont les molécules d'adhésion multivalent (MAM) 6 ou 7. Elles ont été décrites tout d'abord chez *Vibrio parahaemolyticus*, puis chez d'autres bactéries Gram-négatif, dont plus récemment *Shigella sonnei* (Mahmoud et al. 2016; Krachler et al. 2011). MAM7 se lie sur la fibronectine et avec plus d'affinité sur l'acide phosphatidique, ou les deux simultanément (Krachler et Orth 2011). MAM7 possède 7 unités du domaine mce (*mammalian cell entry*), présent chez les bactéries Gram-négatif, Gram-positif et les *Mycobacteria*, chez lesquelles il a été identifié pour la première fois. Son nom provient donc du gène mce1A, car celui-ci est impliqué dans l'adhésion et l'entrée de *Mycobacteria* (Chitale et al. 2001; Arruda et al. 1993). En outre, YebT, un orthologue de MAM7 chez *Escherichia coli*, peut également transporter les lipides entre la membrane interne et la membrane externe (Ekiert et al. 2017; Isom et al. 2017).

1.6. Flagelle

Le flagelle, un organe majeur chez les bactéries, sert en premier lieu à la motilité et au *chemosensing*. Cette structure permet donc à la bactérie d'évoluer vers des niches favorables (Chaban et al. 2015). Cependant son rôle ne s'arrête pas là, puisque sa présence améliore l'adhésion bactérienne sur de nombreux tissus animaux ou végétaux (Figure 27) (Rossez et al. 2015). Dans la littérature, l'interaction du flagelle avec les lipides de la membrane de l'hôte a été bien documentée (Rossi et al. 2019). Le flagelle de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium possède une affinité pour le cholestérol présent à la surface de billes, contrairement aux pili de type I, qui gêneraient même cette adhésion (Crawford et al. 2010). Chez *Pseudomonas*

aeruginosa, le flagelle adhère de préférence aux gangliosides GM1 et aGM1, et est supposé être impliqué dans les étapes précoces d'adhésion en permettant d'atteindre les GMs difficilement accessibles sur la surface apicale (Feldman *et al.* 1998). Plus récemment, la liaison entre plusieurs sérotypes flagellaires d'*Escherichia coli* H7 (EHEC), H6 (EPEC) et H48 (K-12) et des phospholipides membranaires chargés a été observée *in planta*, l'interaction avec la membrane cellulaire serait donc de nature ionique (Rossez *et al.* 2014).

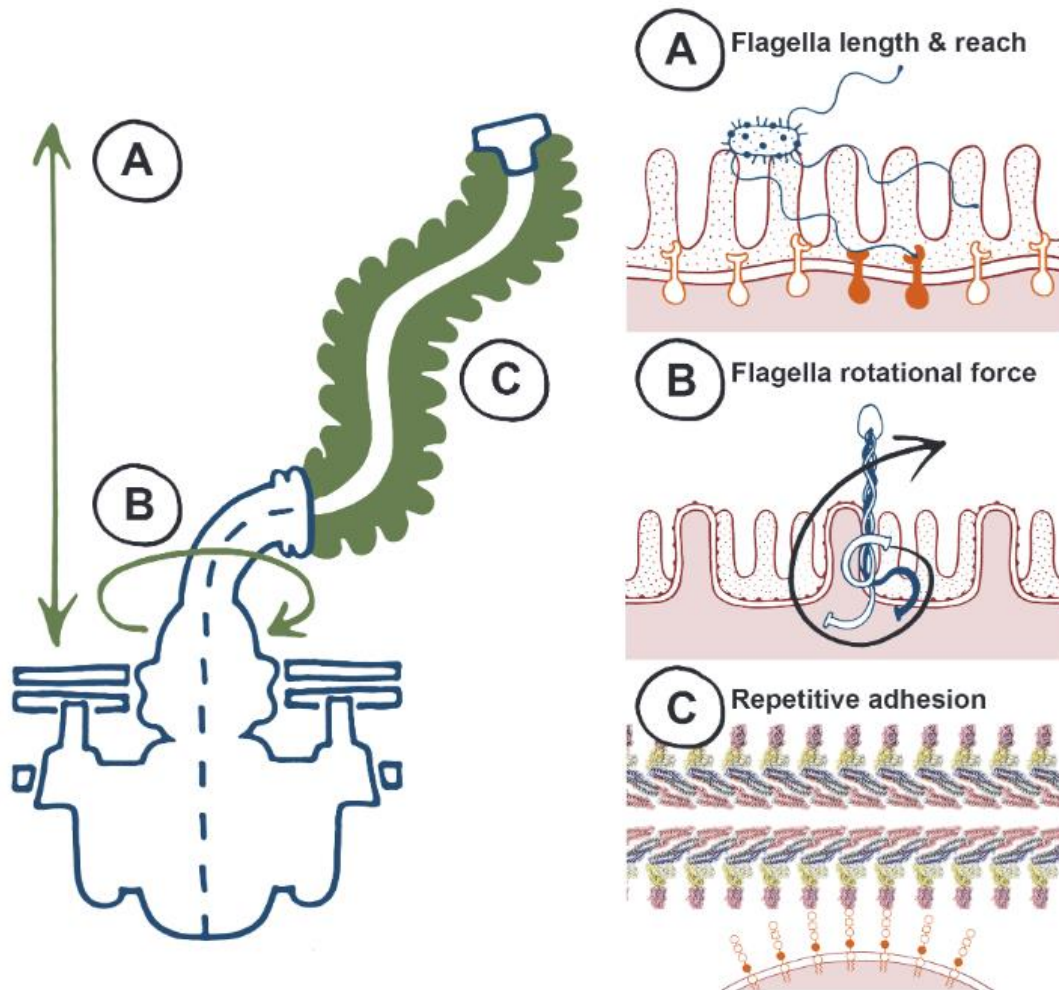


Figure 27 : Les propriétés biophysiques du flagelle pour atteindre de manière non-spécifique des surfaces. (A) Sa longueur, (B) sa rotation et (C) ses multiples sites répétitifs (Rossez *et al.* 2015)

Contrairement aux pili, l'assemblage du flagelle se fait à l'extrémité de la structure naissante. La prochaine partie, intitulée *Le flagelle*, une structure supramoléculaire auto-assemblée, est totalement dédiée à l'assemblage et la composition du flagelle bactérien.

2. Processus de l'adhésion bactérienne

La bactérie, en état planctonique, évolue librement dans un milieu liquide soit de manière active par le biais de la motilité du flagelle, ou dans le cas contraire par force gravitationnelle et mouvement brownien. Ce déplacement est guidé par des signaux environnementaux, dans le but d'atteindre une niche favorable. Par le biais du *chemosensing*, *Helicobacter pylori* atteint préférentiellement les sites gastriques endommagés, tels les ulcères (Aihara *et al.* 2014). Une fois à proximité de la surface, la bactérie adopte des mouvements circulaires, tout en restant à la même distance de la surface. En effet à cette distance, les effets hydrodynamiques sont négligeables, contrairement aux forces de frottements qui ralentissent la course de la bactérie, ponctuée par des adhésions transitoires (Vigeant *et al.* 2002; Lauga *et al.* 2006).

Pour adhérer sur la membrane cellulaire, la bactérie doit passer plusieurs obstacles notamment la barrière répulsive électrostatique, car la membrane des cellules eucaryotiques, tout comme la membrane externe des bactéries, est globalement chargée négativement (Roig 2000). Les interactions seraient donc dans un premier temps de nature hydrophobe, médiées par les organites dont notamment le flagelle qui, par sa motilité, faciliterait le passage de cette barrière (Bruzard *et al.* 2015). La topologie de la surface est également un facteur important, le contact sur des surfaces présentant des microfissures augmente l'adhésion bactérienne médiée par le flagelle (Friedlander *et al.* 2013).

Avant la formation de biofilm bactérien, la perception de la surface par la bactérie *via* ce que l'on appelle le mécanosensing permet la transition d'un état planctonique à un état sessile (Figure 28) (Persat *al.* 2015a). Il est notamment décrit dans la littérature que la sécrétion d'exopolysaccharides (EPS) est fortement liée chez *Bacillus subtilis* et *Vibrio parahaemolyticus* à l'inhibition de la rotation du flagelle (Figure 28B) (Belas 2014). Lorsque le flagelle de *Caulobacter crescentus* adhère à la surface, les forces imposées sur la paroi cellulaire induiraient un changement de conformation des stators flagellaires jouant sur le flux de proton et donc le pH interne de la bactérie (Figure 28C). Ces changements seraient à l'origine de la production d'une adhésine polysaccharide, appelée *holdfast*, de manière à ancrer durablement la bactérie à la surface (Hug *et al.* 2017). La déformation de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* module l'expression d'*icaA*, qui est impliqué dans la synthèse d'EPS (Figure 28A) (Harapanahalli *et al.* 2015). Certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli*, se repositionnent sur l'axe longitudinal pour augmenter la surface de contact et le nombre disponible de protéines de la membrane externe pour renforcer le contact (Berne *et al.* 2018).

De plus, le pilus de type IV a également été identifié comme mécanosenseur chez *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 28D) (Persat *et al.* 2015b). Malheureusement, les mécanismes de l'hôte pour empêcher l'adhésion de pathogènes ne font parfois, que renforcer l'adhésion de certaines bactéries. En effet sous un flux important, l'adhésine du pilus de type I FimH subit un changement de conformation menant à une adhésion plus forte (Sauer *et al.* 2016). En revanche lorsque le flux est faible, les bactéries par le biais du pilus de type I, adoptent un mouvement nommé *stick and roll*, où elles se déplacent dans le sens du flux tout en restant attaché, permettant de maintenir un contact privilégié avec la surface (W. E. Thomas *et al.* 2004).

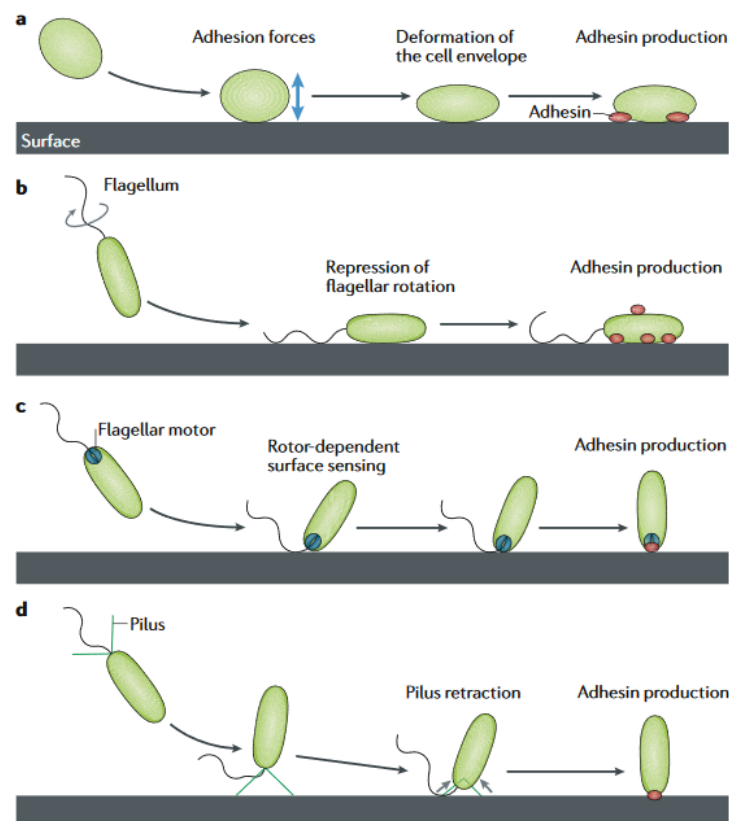


Figure 28 : Mécanisme de production d'adhésines suite au contact avec une surface. (A) Déformation de la paroi cellulaire, (B) Inhibition de la rotation flagellaire, (C) Contact à la base du flagelle entraîne un changement de conformation du moteur et (D) Rétraction des pili (Berne *et al.* 2018)

L'adhésion entraîne également l'activation de facteurs de virulence, tels que LEE (Alsharif *et al.* 2015). Chez *Salmonella enterica*, la présence de l'adhésine SiiE sécrétée par le système de sécrétion de type I, interagit avec les mucines transmembranaires apicales MUC1, permettant le positionnement adéquat de l'appareil de sécrétion de type III et ainsi une translocation d'effecteurs optimale (Barlag et Hensel 2015; X. Li *et al.* 2019). Les adhésines ont parfois un double rôle, par exemple, MAM7 en se liant à l'acide phosphatidique active la GTPase RhoA et ainsi un réarrangement de l'actine (Lim *et al.* 2014).

3. Les solutions anti-adhésion, une alternative aux antibiotiques ?

Face à la multiplication de la résistance aux antibiotiques, les solutions anti-adhésion apparaissent comme une alternative. En effet, l'adhésion étant une étape essentielle dans l'infection bactérienne, la cibler est une stratégie pour lutter contre leur virulence (Figure 29) (Krachler et Orth 2013).

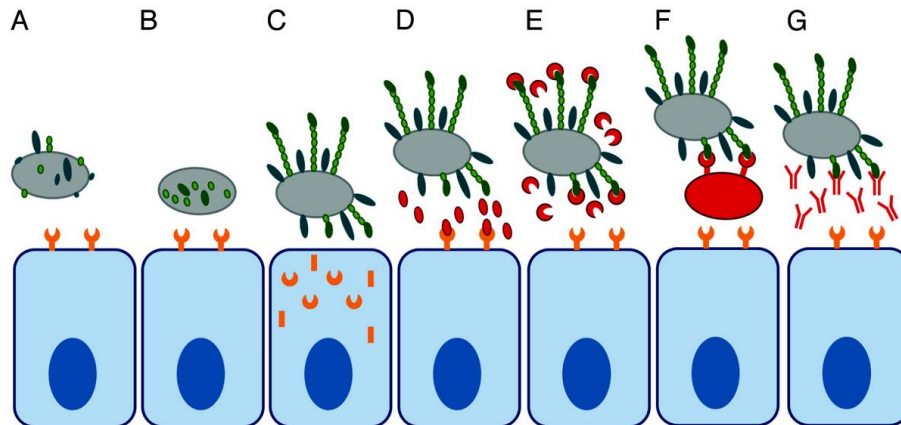


Figure 29 : Stratégies pour la thérapie anti-adhésion. (A) Blocage de la biosynthèse de l'adhésine. (B) Inhibition de l'assemblage de (B) l'adhésine ou du (C) récepteur de l'hôte. Remplacement compétitif : (D) des adhésines contre l'hôte ou (E) des récepteurs de l'hôte contre les adhésines. (F) Développement de micro-organismes exposant les récepteurs de l'hôte à leur surface. (G) Des anticorps dirigés contre les adhésines bactériennes (Krachler et Orth 2013)

Plusieurs pistes sont possibles, la première est de rendre les adhésines non fonctionnelles en empêchant leur biogenèse ou en bloquant le site de liaison au récepteur (Figure 29B et E). De cette manière, les bactéries deviennent plus vulnérables aux mécanismes d'élimination. Certaines molécules possédant un squelette de 2-pyridone ont un pouvoir pilicide, en interagissant avec la chaperonne des CU pili (Chorell *et al.* 2012). Son action sur les pili de type I, P et S permet de diminuer la colonisation d'UPEC sur modèle murin (Greene *et al.* 2014). De manière analogue, des curlicides ont également été mis au point (Cegelski *et al.* 2009). Concernant les pili chez les bactéries Gram-positif, ceux-ci sont quant à eux ciblés par le biais des enzymes sortases. Un oligopeptide LPRDA, basé sur le motif LPXTG des pilines, occupe le site actif des sortases de classe A et impact les activités de *Staphylococcus aureus*, sans affecter la viabilité cellulaire *in vivo* (J. Wang *et al.* 2018). De nombreuses études s'intéressent à la neutralisation de FimH, l'adhésine du pilus de type I. En présence de méthyl α -D-mannopyranoside, un inhibiteur compétitif du mannose, une réduction de l'infection des voies urinaires a été observée (Aronson *et al.* 1979). Depuis cette étude, l'efficacité a été améliorée par la multivalence ou par une meilleure affinité en modifiant la poche polaire du motif aglycone du mannose (Krammer *et al.* 2018). Par exemple, le mannoside biarylique possède une constante de dissociation avec FimH

de 3,5 nM contre 1672 nM, toutes deux déterminées par titrage calorimétrique isotherme (Pang *et al.* 2012; Wellens *et al.* 2012). De manière naturelle, certains aliments peuvent être riches en composés inhibiteurs de l'adhésion. La consommation de jus de cranberries est connue pour protéger contre les infections urinaires, de par la présence de fructose agissant sur l'adhésine du pilus de type 1, et grâce également à la proanthocyanidine, dont l'activité anti-adhésive contre le P-pilus a été démontrée *in vitro* (Howell 2007). Enfin, certains probiotiques peuvent être modifiés pour devenir des leurres en exprimant à leur surface des récepteurs de l'hôte, en plus de diminuer la quantité de nutriments disponibles (Figure 29F) (Paton *et al.* 2006).

Un autre axe est d'immuniser l'hôte contre l'adhésine elle-même ou un de ses constituants, activement par vaccination ou passivement par l'injection d'anticorps (Figure 29G). Un vaccin à partir de plusieurs composants : EspA, adhésine présente sur T3SS, intimine et Tyr, permet de réduire efficacement la propagation d'O157:H7 chez les bovins, qui sont des porteurs sains de cette bactérie (McNeilly *et al.* 2010). Cependant, l'antigénicité, les modifications post-traductionnelles ou la variation de phase peuvent limiter leur efficacité. C'est notamment le cas pour le flagelle, qui est une cible intéressante, car il est distribué sur une majorité de bactéries (Chintoan-Uta *et al.* 2016).

Contrairement aux antibiotiques, les solutions anti-adhésion n'affectent pas la viabilité du pathogène, ni celle des bactéries commensales. Pourtant une pression de sélection semble aussi exister face à cette nouvelle thérapie. En revanche dans ce cas, l'adaptation à ces nouvelles conditions environnementales résultantes d'un traitement anti-adhésion n'est pas forcément avantageuse pour la bactérie, notamment sur un autre individu n'ayant pas suivi de traitement (Allen *et al.* 2014). De plus, la propagation de ces modifications par transfert horizontal des gènes serait limitée, étant donné que chaque adhésine n'est pas universellement partagée. *A contrario*, l'approche qui vise à utiliser les thérapies anti-adhésion est complètement différente, et nécessite plus de réflexion que pour l'utilisation d'antibiotiques. En particulier, l'identification du pathogène est indispensable, et dans l'attente il n'existe pas de thérapies anti-adhésion à spectre large, comme le peuvent être certains antibiotiques. De plus, la synchronisation de l'administration du traitement et l'expression de l'adhésine, doit être maîtrisée pour être efficace (Totsika 2017). Au final, elles reposent sur la capacité de l'organisme à éliminer les bactéries pathogènes par le biais du système immunitaire ou de mécanismes de clairance. Ces thérapies sont donc pour l'instant principalement destinées en prévention pour des patients à risque, et en curatif comme adjuvant pour réduire la quantité d'antibiotiques (S. W. Dickey *et al.* 2017).

IV. Le flagelle, une structure supramoléculaire auto-assemblée

Cette partie a pour objectif de présenter la structure du flagelle dans toute sa globalité, en particulier chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*, figurant d'ailleurs parmi les flagelles les plus étudiés (Minamino, Morimoto, *et al.* 2018). Ces entérobactéries sont issues d'un même ancêtre commun (Karberg *et al.* 2011). De plus, elles possèdent toutes deux une ciliature péritriche, qui se caractérise par la présence de flagelles sur l'ensemble de leur paroi cellulaire. Le flagelle est composé d'environ 30 protéines, présentes avec des stœchiométries très variables. Ce complexe s'étend du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule et se divise en 3 parties principales présentées en Figure 30 (Macnab 2003) :

- le corps basal, se situant dans la membrane plasmique et la paroi bactérienne, joue le rôle d'un moteur rotatif capable de tourner dans un sens puis dans un autre (Morimoto et Minamino 2014)
- le coude, un joint universel flexible transmettant la rotation du corps basal au filament
- le filament, pouvant s'étendre à 15-20 μm de la surface de la cellule, est principalement constitué d'une seule et même protéine, la flagelline, dont la polymérisation peut inclure jusqu'à 20 000 unités, et est rendue possible grâce à la coiffe se trouvant à son extrémité.

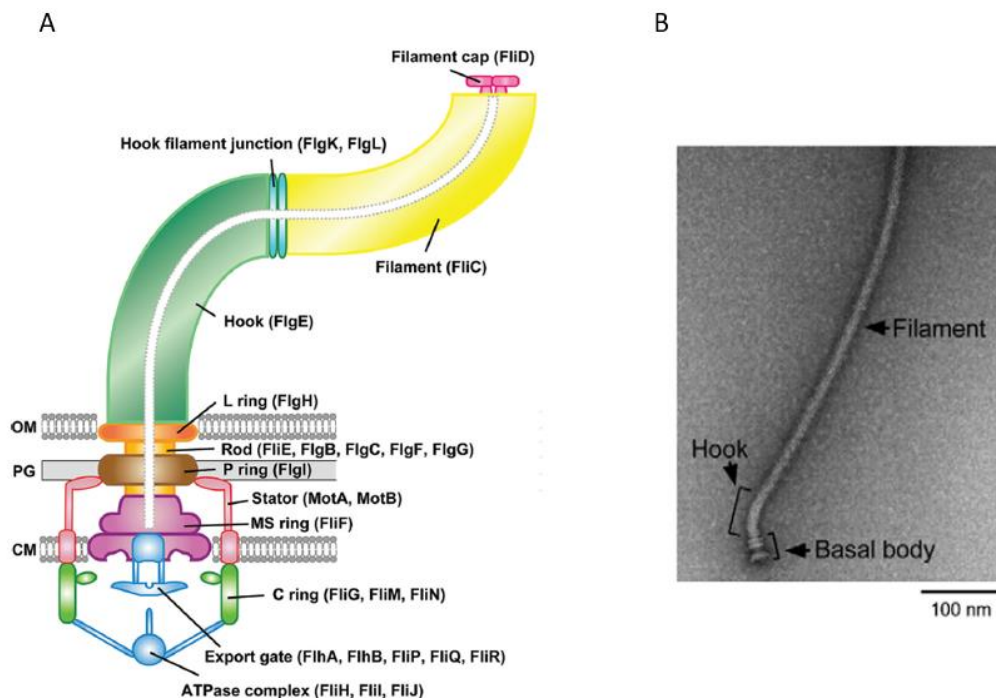


Figure 30 : **Structure du flagelle bactérien.** (A) Composition protéique de chaque entité indiquée entre parenthèses (Minamino, Morimoto, *et al.* 2018). (B) Flagelle isolé de *Salmonella enterica* par microscopie électronique (Minamino, Imada, *et Namba* 2008). OM : outer membrane, PG : peptidoglycan layer, CM : cytoplasmic membrane

1. La machinerie cellulaire

1.1. L'anneau Membrane-Supramembrane, la base du flagelle

L'anneau Membrane-Supramembrane (MS) constituerait la première étape dans l'assemblage du flagelle, puisque celui-ci est capable de se former en l'absence des autres composants flagellaires (Kubori *et al.* 1992). Cet anneau a été observé pour la première fois en 1971 sur des flagelles isolés, sur lesquels 4 anneaux pouvaient être observés au niveau du corps basal. Ceux-ci ont été nommés selon leur emplacement dans la cellule : L pour lipopolysaccharide, P pour peptidoglycane, S pour supramembrane et M pour membrane (DePamphilis et Adler 1971). Il s'avèrera par la suite que les anneaux M et S étaient constitués d'une même protéine FliF, formant ainsi un seul et même anneau appelé anneau MS, qui se poursuit également sur une partie de la tige proximale (Ueno *et al.* 1992). Plus particulièrement, l'anneau MS se compose de 26 copies de FliF chez *E. coli* et *S. enterica* (Suzuki *et al.* 2004). Même si la surexpression de FliF chez *E. coli* conduit à la formation de l'anneau MS (Ueno *et al.* 1992), l'initiation de celui-ci démarrerait à partir de l'oligomérisation de FlhA, un composant de l'appareil d'export (H. Li et Sourjik 2011). D'autre part chez *S. enterica*, FliF a besoin de FliG pour former de manière efficace l'anneau MS (Morimoto *et al.* 2014). En effet, FliG se situe sur la face cytoplasmique de l'anneau MS avec une stœchiométrie de 1 FliG : 1 FliF, *via* une interaction avec le domaine N-terminal de FliG (Francis *et al.* 1992; Kihara *et al.* 2000; Levenson *et al.* 2012). De plus, il semble peu probable au vu de la taille de l'anneau MS, que celui-ci soit directement inséré par le système de sécrétion Sec dans la membrane (Macnab 2003). Au final, sa formation reposerait plutôt sur un assemblage coopératif avec d'autres protéines flagellaires, que par sa seule présence, même s'il est requis pour l'assemblage du flagelle (Morimoto *et al.* 2014).

1.2. Système de sécrétion de type III, le cœur du flagelle

Le T3SS flagellaire s'insère au niveau de l'anneau MS (Minamino 2018). Il se compose d'un appareil d'export transmembranaire constitué de FlhA, FlhB, FliP, FliQ, FliO et FliR, fonctionnant avec une force proton-motrice (PMF). Cet appareil d'export est associé à un complexe ATPase cytoplasmique constitué de FliH, FliI et FliJ (Figure 31). Ces composants présentent une très forte homologie avec leur analogue T3SS de l'injectosome, dont ils seraient les ancêtres (Abby et Rocha 2012). Cependant, leur rôle reste généralement très différent. L'injectosome sécrète des effecteurs dans les cellules hôtes, alors que le flagelle sécrète des unités de la tige, du coude et du filament *via* le canal central de la structure naissante (Iino 1974). Cependant certaines

bactéries, comme *Campylobacter jejuni* et *Yersinia enterocolitica*, sécrètent par le biais de leur flagelle des composés qui ne sont pas destinés à son assemblage, mais qui peuvent avoir des fonctions de phospholipase ou d'adhésine (Young *et al.* 1999; Y. C. Song *et al.* 2004).

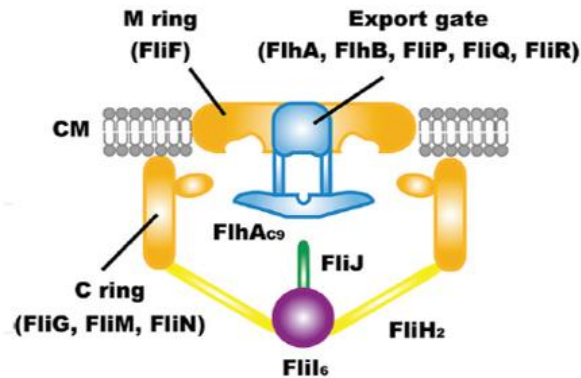


Figure 31 : Système de sécrétion de type III flagellaire, composée d'un appareil d'export fonctionnant avec une PMF et d'un complexe ATPase nécessaire à la robustesse du système. La composition protéique est précisée entre parenthèses. CM : cytoplasmic membrane (Minamino, Morimoto, et al. 2018)

1.2.1. PMF et complexe ATPase, deux rôles complémentaires

L'anneau ATPase cytoplasmique se compose de 6 copies de l'ATPase FliI (Fan et Macnab 1996), 6 copies de l'homodimère FliH, un régulateur négatif de FliI (González-Pedrajo *et al.* 2002; Minamino et Macnab 2000) et une copie de FliJ qui améliore l'activité de FliI (Ibuki *et al.* 2011). Le complexe ATPase est situé à la base du flagelle *via* l'interaction entre la région N-terminale de FliH avec FliA et FliN de l'anneau C (González-Pedrajo *et al.* 2006; Hara *et al.* 2012; Minamino *et al.* 2009) (Figure 31).

L'activité ATPase, qui a longtemps été suggérée d'apporter l'énergie nécessaire pour l'export (Fan et Macnab 1996), n'est finalement pas indispensable à cette fonction contrairement à la PMF (Minamino et Namba 2008; Paul *et al.* 2008). Cependant, l'activité ATPase permettrait un meilleur fonctionnement de l'appareil d'export, en promouvant la translocation des protons vers l'intérieur de l'appareil d'export (Morimoto *et al.* 2016). Etant donné qu'une activité ATPase 100 fois plus faible conduit à la formation d'un flagelle possédant une taille deux fois plus petite, il est suggéré que l'hydrolyse d'ATP et l'export de protéines ne soient pas couplés (Minamino *et al.* 2014). De plus, l'augmentation de la production d'unités à exporter ou de PMF suffit à combler l'absence d'activité ATPase, pour former un flagelle fonctionnel (Erhardt *et al.* 2014). Ainsi, l'appareil d'export serait un antiport proton-protéine (Minamino, Morimoto, *et al.* 2011).

1.2.2. L'appareil d'export, un antiport proton-protéine

FliA, une protéine transmembranaire de l'appareil d'export, pourrait jouer le rôle de transducteur de protons. Elle possède deux domaines cytoplasmiques, une petite partie située entre ses domaines transmembranaires 4 et 5, appelée FHIPEP (pour *Flagellum/hypersensitive response/invasion protein export pore*), et un autre domaine beaucoup plus large appelé FliA_C. Le domaine FHIPEP, abritant 68 acides aminés très conservés, contient de nombreux résidus capables de se lier aux protons (McMurry *et al.* 2004). Plusieurs résidus apparaissent critiques pour le transport de protons, la protonation d'un de ces résidus entraîne une réorganisation conformationnelle, qui impacte FliA_C, lui-même responsable de l'amarrage des unités à sécréter (Erhardt *et al.* 2017).

Le conduit protéique serait quant à lui constitué de FliP qui formerait un anneau homohexamérique, avec éventuellement FliR et FliQ, aidé par FliO (Fukumura *et al.* 2017; Ward *et al.* 2018). Plus récemment, une étude a déterminé une stœchiométrie différente du T3SS à 5 FliP, 4 FliQ et 1 FliR. La structure P₅Q₄R₁ par Cryo-EM révèle une géométrie pseudo-hexamérique hélicoïdale, se positionnant plus haut dans le corps basal que ce qui était pensé jusqu'à présent (Figure 32). L'ouverture du conduit, par lequel les protéines sont sécrétées, pourrait être fermée ou ouverte selon la relaxation des sous-unités FliP et FliR (Kuhlen *et al.* 2018). Cette nouvelle structure serait aussi bien valable chez le flagelle que l'injectosome, d'autant plus que FliP, FliQ et FliR sont très bien conservés entre les systèmes flagelle et injectosome (Erhardt *et al.* 2010).

FliO est la seule protéine flagellaire du T3SS qui n'est pas retrouvée chez l'injectosome, pourtant celle-ci est essentielle à l'assemblage du système (Barker *et al.* 2014), mais pas pour le transport en lui-même (Barker *et al.* 2010). C'est une protéine bitopique avec un large domaine C-terminal cytosolique, qui aurait en réalité une fonction de chaperonne en protégeant FliP d'une dégradation protéolytique et en permettant une formation stable de FliP-FliR pour la formation du T3SS (Fabiani *et al.* 2017).

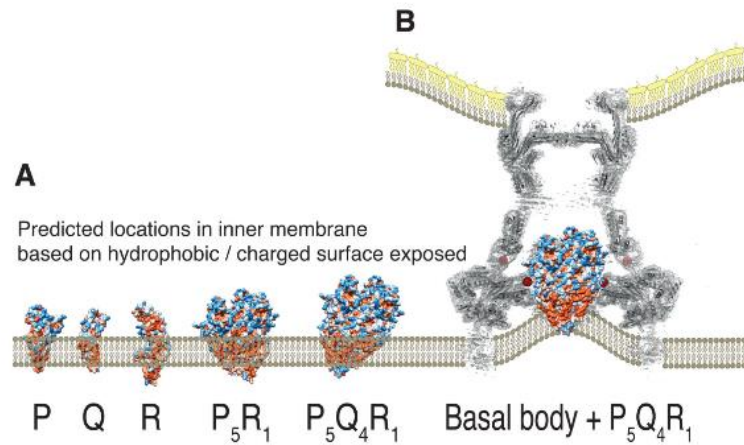


Figure 32 : Structure prédictive de l'appareil de sécrétion de type III flagellaire et de l'injectosome. (A) Prédiction de la location de FliP (P), FliQ (Q), FliR (R), ainsi que différents assemblages, d'après leur domaine transmembranaire et leur partie exposée dans le cytoplasme. (B) Positionnement du complexe P₅Q₄R₁ au niveau du corps basal (Kuhlen et al. 2018)

1.2.3. Transport des unités du cytoplasme vers l'appareil d'export

FliN, FliT et FliS sont les chaperonnes respectives des protéines de jonction coude-filament FliK et FliL, de la coiffe du filament FliD et de la flagelline FliC (Auvray *et al.* 2001; Fraser *et al.* 1999). Elles ont pour principales fonctions de protéger leur substrat respectif de la dégradation et de les stabiliser en se liant au niveau de leur domaine C-terminal (Ozin *et al.* 2003). En effet, ces substrats ont tendance à s'oligomériser *via* leurs extrémités non repliées, FliS en se liant à FliC empêche sa polymérisation *in vitro* (Auvray *et al.* 2001; F. A. Samatey *et al.* 2001). Le complexe chaperonne-substrat s'organise selon une stœchiométrie 1:1 (Imada *et al.* 2010; Kinoshita *et al.* 2016; Muskotál *et al.* 2006).

FliT est composé de 4 hélices α , dont le site de liaison pour FliD se situe sur l'hélice α 3 au niveau du résidu Lys-79 (Imada *et al.* 2010). Cependant ce site n'est pas directement accessible, car l'hélice α 4 obstrue le cœur hydrophobe formé par les hélices α 2 et α 3, pour éviter l'agrégation de FliT en présence de solvant (Imada *et al.* 2010). La délétion de l'hélice α 4 n'affecte pas l'interaction avec FliD, mais au contraire augmente la liaison FliT-FliD d'un facteur 10 (Khanra *et al.* 2016). L'analyse par cristallographie du complexe FliT-FliD montre que l'hélice C-terminale de FliD prend la place de l'hélice α 4 de FliT, provoquant également l'élongation de l'hélice α 3 de 3 tours (Figure 33) (Khanra *et al.* 2016). Les autres chaperonnes FliS et FliN, ayant une structure similaire composée de plusieurs hélices α , possèderaient ce même mécanisme (Kinoshita *et al.* 2016; Sajó *et al.* 2016). Ce mouvement de charnière a été également identifié chez FliN, où l'hélice α 1 cache la cavité formée par les hélices α 2 et α 3, abritant le site de liaison avec FliK au

niveau des résidus Asn-92, Asp-95 et Ile-103 de l'hélice $\alpha 3$ (Kinoshita *et al.* 2016). D'autre part, ces hélices α mobiles constituent le site de liaison des chaperonnes avec FlhA (Khanra *et al.* 2016).

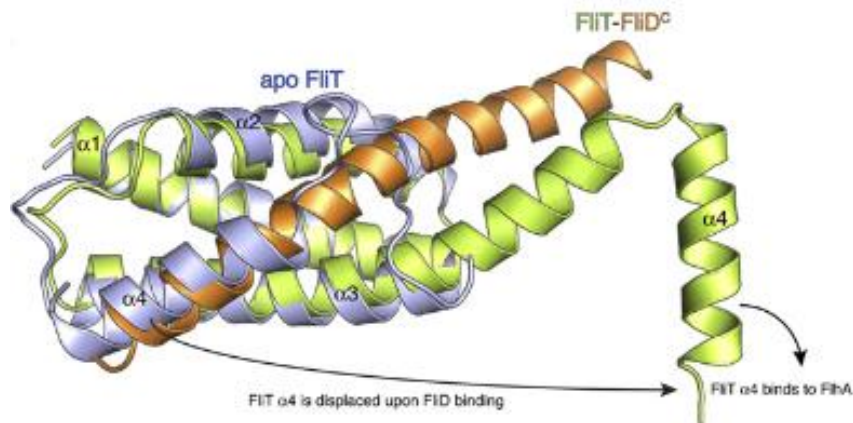


Figure 33 : *Superposition des structures FliT seule et du complexe FliT-FliD^C. La liaison de la chaperonne FliT avec son substrat FliD (dont le site de liaison est en C-terminal de FliD, d'où FliD^C) provoque des changements conformationnels chez FliT comme le déplacement de l'hélice $\alpha 4$, remplacée par FliD^C, et l'élongation de l'hélice $\alpha 3$. FliT seule (apo FliT) est en bleu, FliT lié à FliD^C en vert et FliD^C en marron (Khanra *et al.* 2016)*

Les chaperonnes conduisent leur substrat à l'appareil d'export transmembranaire au niveau du domaine cytoplasmique FlhA, nommé précédemment FlhA_C. Ce domaine cytoplasmique, divisé en 4 sous-domaines, est relié au niveau de son extrémité N-terminale à la base transmembranaire *via* un linker appelé FlhA_L. La liaison entre la chaperonne et son substrat est un pré-requis pour interagir avec FlhA_C, FliC et FliD ne se lient qu'en présence de leur chaperonne à FlhA_C (Bange *et al.* 2010). De plus, le complexe FlgN-FlgK a une meilleure affinité que FlgN seul pour FlhA_C (Minamino, Kinoshita, Hara, *et al.* 2012). En réalité, la liaison du substrat avec sa chaperonne permet de dégager le site de liaison avec FlhA_C et ainsi d'éviter la liaison avec l'appareil d'export sans substrat (Khanra *et al.* 2016). Cette interaction se fait au niveau de la région la plus conservée de FlhA_C, qui est une cavité hydrophobe située entre les sous-domaines D1 et D2 (Figure 34A-B) (Kinoshita *et al.* 2013; Minamino, Kinoshita, Hara, *et al.* 2012). L'analyse cristallographique de FlhA_C-FliT-FliD_C et FlhA_C-FliS-FliC_C, associée à la RMN, ne montre aucune interaction entre les constituants flagellaires FliD, FliC et FlgN avec FlhA_C, et mettent en évidence l'implication de Tyr106, Tyr10 et Tyr122 respectivement chez FliS, FliT et FlgN dans la liaison avec FlhA_C (Figure 34C-D) (Xing *et al.* 2018; Kinoshita *et al.* 2013).

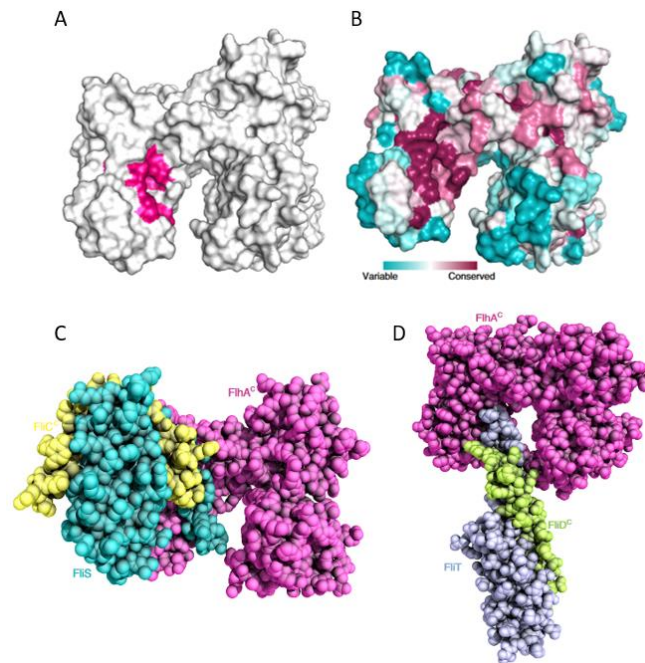


Figure 34 : Interaction de FlhA^C au niveau de sa région la plus conservée avec différents complexes chaperonne/substrat. (A) Site de liaison des complexes chaperonne/substrat sur FlhA^C, représenté en rose. (B) Ce site de liaison correspond à la région la plus conservée de FlhA^C. Structure des complexes FlhA^C-FliS-FliC^C (C) et FlhA^C-FliT-FliD^C (D), ces liaisons n'impliquent pas de liaison entre FlhA^C et les substrats FliC et FliD (Xing et al. 2018)

FliH et FliI forment dans le cytoplasme des complexes FliH₂FliI (Minamino et Macnab 2000), qui peuvent se lier au système chaperonne-substrat FlgN/FlgK et FliT/FliD, mais pas FliS/FliC (Minamino, Kinoshita, Imada, *et al.* 2012; Sajó *et al.* 2014; J. Thomas *et al.* 2004). Cette interaction permettrait de les transporter vers l'appareil d'export, grâce à une interaction privilégiée avec FlhA_C (Bai *et al.* 2014). D'autre part, FliJ en se liant au linker FlhA_L, permet d'augmenter la liaison du complexe FliT/FliD avec FlhA_C, contrairement à FliS/FliC (Bange *et al.* 2010). De plus, FlhA_C possède une affinité pour le complexe FlgN/FlgK légèrement supérieure au complexe FliT/FliD et 14 fois supérieure au complexe FliS/FliC (Kinoshita *et al.* 2013). L'ordre d'assemblage du flagelle est comme suit : protéines jonction coude-filament FlgK et FlgN, suivies de la coiffe FliD, puis de la flagelline FliC (Homma *et al.* 1984). Leurs diverses interactions ou non avec FliH₂FliI, FliJ et FlhA_C permettraient de respecter cet ordre hiérarchique, en favorisant les protéines mineures devant la quantité importante de flagelline.

1.3. Le moteur bidirectionnel

L'anneau C, formé durant les premières étapes de l'assemblage du flagelle, se compose de 3 protéines FliG, FliM et FliN qui constituent le complexe *switch* (Francis *et al.* 1994). Ce complexe est nommé ainsi, car il permet aux bactéries d'alterner entre 2 modes : le *run* et le *tumbling*. Le

run se produit quelques secondes pendant lesquelles les flagelles tournent en sens antihoraire (CCW, *counter clockwise*) et ne forment plus qu'un faisceau, permettant à la bactérie de se déplacer rapidement en ligne droite. Brusquement, en moins d'une seconde, le sens de rotation des flagelles s'inverse en sens horaire (CW, *clockwise*) et provoque la désolidarisation des flagelles appelée *tumbling*, et entraîne l'arrêt de la bactérie (Berg et Brown 1972). Ce changement de rotation de CCW à CW est provoqué par la protéine CheY-phosphorylé (CheY-P), qui est responsable de la chimiotaxie. Sa liaison avec le complexe *switch* augmente la probabilité d'une rotation CW (Cluzel *et al.* 2000).

1.3.1. Formation de l'anneau C

La formation de l'anneau C commence par FliG. FliG se divise en 3 domaines : FliG_N (N-terminal), FliG_M (domaine central) et FliG_C (C-terminal) relié respectivement par l'hélice_{NM} et l'hélice_{MC} (L. K. Lee *et al.* 2010). L'anneau FliG se polymérise par le biais d'un mécanisme *domain-swap* passant d'une interaction intramoléculaire à intermoléculaire de FliG_M et FliG_{CN}, *via* une liaison qui implique les répétitions Armadillo (ARM) : ARM_M et ARM_C (Figure 35) (Baker *et al.* 2016; L. K. Lee *et al.* 2010). Les ARMs sont composés d'environ 40 acides aminés, dont des résidus hydrophobes conservés qui permettent leur empilement en tandem par le biais de super-hélices droites (Huber *et al.* 1997). L'anneau MS permet la polymérisation de FliG dans de bonnes conditions, car l'interaction de FliG_N avec FliF permet la bonne position de FliG et augmente également sa concentration locale (Baker *et al.* 2016; Kihara *et al.* 2000; Levenson *et al.* 2012). FliM permettrait aussi la polymérisation de FliG, en revanche FliM ne serait pas capable de s'associer sans la présence de FliG (E. A. Kim, Panushka, Meyer, Ide, *et al.* 2017). Le complexe stable formé par 1 FliM : 4 FliN se lie à FliG, par le biais de l'interaction entre FliM_M et FliG_M, pour former un ensemble caliciforme donnant l'anneau C (Paul et Blair 2006; Vartanian *et al.* 2012).

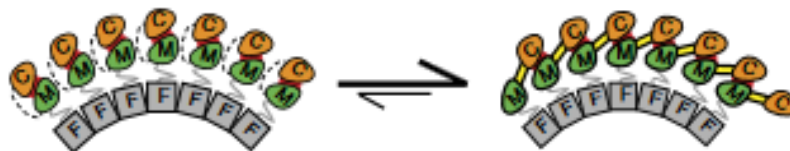


Figure 35 : Polymérisation de l'anneau FliG par le mécanisme de domain-swap d'interactions intramoléculaires à intermoléculaires. C en orange représente le domaine FliG_C, M en vert le domaine FliG_M, en gris FliF et l'hélice_{MC} symbolisé en pointillé en intra car déstructuré et en jaune en inter. Les interactions entre ARMs sont en rouge (Baker *et al.* 2016)

1.3.2. Le complexe switch

L'ensemble des anneaux MS-C forme un rotor réversible et permet la génération du couple moteur. CheY-P se lie d'abord sur FliM_N puis sur FliN (Bren et Eisenbach 1998; Sarkar *et al.* 2010), modifiant la conformation de FliG à l'origine du changement de rotation de CCW vers CW (Dyer *et al.* 2009).

Plus précisément, le changement de conformation de FliG implique d'abord celui de l'hélice_{MC}, qui relie FliG_M et FliG_C (Van Way *et al.* 2004). Ceci a été démontré par des mutations au niveau de la boucle entre FliG_M et l'hélice_{MC}, qui provoque un phénotype d'extrême biais pour CW chez *S. enterica*, même en présence de CheY (Togashi *et al.* 1997). Ces mêmes mutations conduisent à un détachement de l'hélice_{MC} du domaine FliG_M, sur la structure cristalline de FliG chez *Thermotoga maritima* (Minamino, Imada, *et al.* 2011). Ainsi, cette configuration ouverte de l'hélice_{MC} correspondrait à la rotation CW (Figure 36) (L. K. Lee *et al.* 2010).

Le passage de la configuration fermée à ouverte de l'hélice_{MC} provoquerait la rotation à 180° de l'hélice_{C5} située dans le domaine C-terminal de FliG_C (Lam *et al.* 2012; L. K. Lee *et al.* 2010), interagissant avec MotA une protéine du stator *via* des résidus chargés (J. Zhou *et al.* 1998). Intermédiairement, un changement de sens du *domain-swap* du côté gauche en CCW vers le côté droit en CW pourrait être le lien entre ces deux hélices (Kinoshita *et al.* 2018).

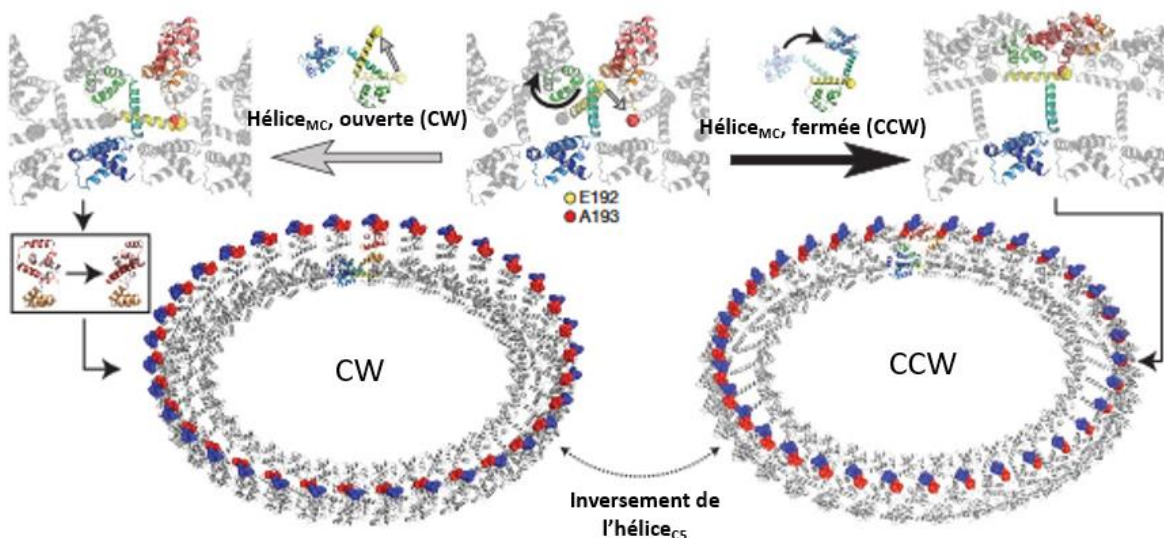


Figure 36 : Echange moléculaire entre la rotation CW et CCW. Les résidus chargés positivement sur l'hélice_{C5} sont en bleu et négativement en rouge. L'hélice_{MC} est représentée en jaune (Adapté de L. K. Lee *et al.* 2010)

(Kudo *et al.* 1990). Chaque stator est constitué de 4 copies de MotA et 2 copies de MotB (Kojima et Blair 2004), formant 2 conduits à protons (Figure 38A) (Braun et Blair 2001). Les interactions électrostatiques entre MotA et FliG, en plus de la génération du couple, sont également importantes pour l'assemblage du stator au niveau du rotor (Morimoto *et al.* 2013; 2010). Celles-ci provoquent un changement de conformation de la région N-terminale de MotB_C, qui permet d'atteindre le peptidoglycane et d'ouvrir le canal à protons (Figure 38B) (Kojima *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2014). De fait, MotB possède un site de liaison au peptidoglycane au niveau de sa région périplasmique C-terminale (Kojima *et al.* 2008). La liaison entre le peptidoglycane et MotB_C permet le passage de la forme non activée à la forme activée (Minamino et Imada 2015).

Cependant, cet assemblage n'est pas définitif, puisque chaque stator reste lié au rotor en moyenne 30 secondes et retourne dans le cytoplasme (Leake *et al.* 2006). En effet, la liaison avec le peptidoglycane est réversible et permet d'adapter le nombre de stators selon l'environnement dans lequel évolue la bactérie (Castillo *et al.* 2013; Kojima *et al.* 2018). Le complexe MotA et MotB possède notamment une sensibilité aux contraintes mécaniques, ce qui permet d'adapter le nombre de stators en fonction de la charge du milieu. A haute viscosité, le nombre de stators est à son maximum et diminue à faible viscosité (Lele *et al.* 2013; Tipping *et al.* 2013). Jusqu'à 11 stators peuvent être accommodés sur les anneaux MS et C (Reid *et al.* 2006).

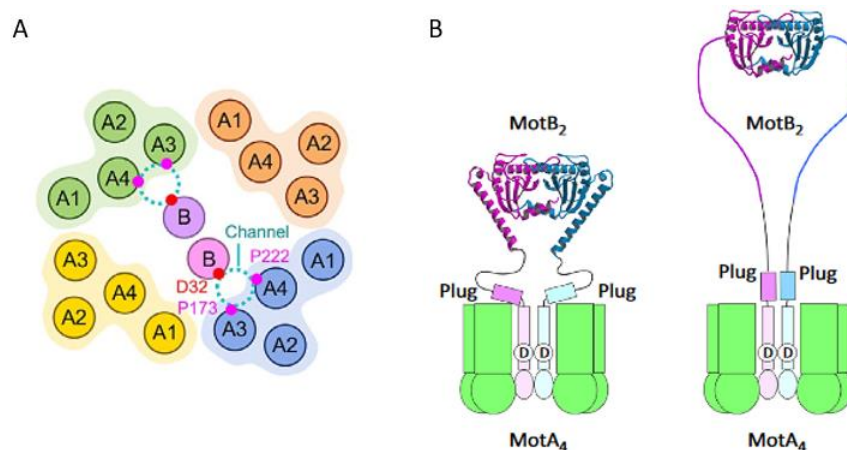


Figure 38 : Structure des stators formés par les complexes MotA₄MotB₂. (A) Vue à partir du côté périplasmique de la membrane, organisation des domaines transmembranaires A pour MotA et B pour MotB, formant 2 canaux à proton impliquant des résidus importants D32, P173 et P222 (Minamino, Terahara, et al. 2018) (B) Vue à travers la membrane, à gauche le complexe est désactivé et à droite activé par la liaison de MotB_C avec le peptidoglycane, une fois le stator lié au moteur. MotB_C est montré en ruban (Minamino et Imada 2015)

2. Structure axiale du flagelle : de la tige à la coiffe du filament

2.1. Caractéristiques générales

Contrairement aux pili, les unités du flagelle sont sécrétées et assemblées à l'extrémité de la structure naissante (Iino 1974). L'assemblage du flagelle, que ce soit la tige, le coude ou le filament, repose sur la formation de superbes hélices α grâce à la présence d'heptapeptides répétées, au niveau des régions désordonnées N- et C-terminales des unités axiales flagellaires (Figure 39) (Homma *et al.* 1990; Vonderviszt *et al.* 1998). Ces régions terminales n'étant pas repliées, ont besoin d'une amorce pour s'auto-assembler, c'est notamment le cas pour la reconstruction *in vitro* de filaments (Asakura 1970). En outre, contrairement à ces dernières, les régions centrales sont très variables et à l'origine de la diversité antigénique de la flagelline (Beatson *et al.* 2006). Ces structures s'organisent en 11 protofilaments chez *S. enterica*.

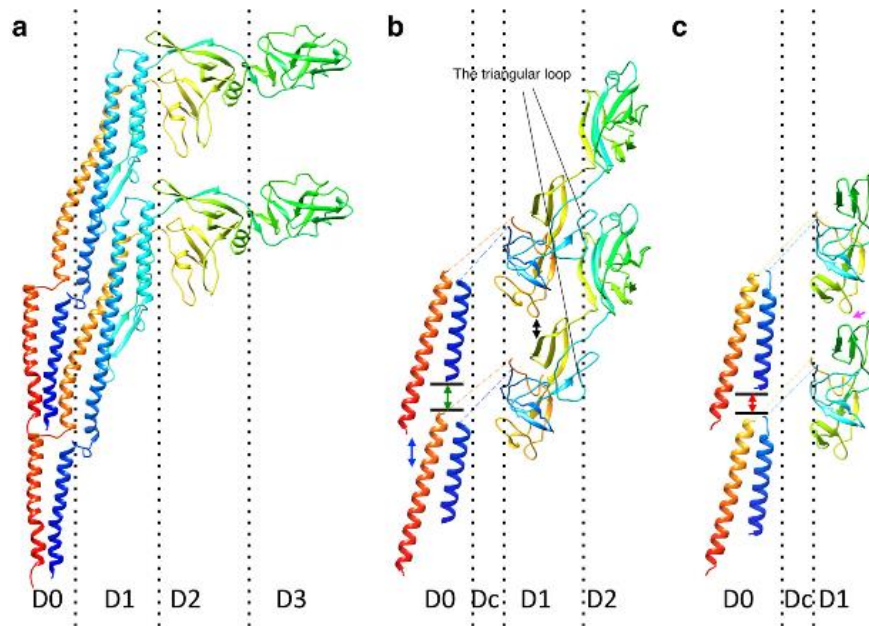


Figure 39 : Comparaison de l'organisation axiale des différents constituants du flagelle : (a) filament (FliC), (b) coude (FlgE) et (c) tige (FlgG). Les séquences sont colorées allant du bleu vers le rouge, pour respectivement du domaine N- au C-terminal. Contrairement aux hélices D0 de FliC, les hélices D0 de FlgE sont espacées (double flèche bleue). L'hélice N-terminale de la tige FlgD est plus longue d'un tour (double flèche rouge), que celle de FlgE (double flèche verte). Les domaines D1 de FlgG interagissent entre eux (flèche magenta), alors que pour FlgE ils sont espacés (double flèche noire) (Imada 2017)

2.1.1. Tige

La tige, qui mesure environ 25 nm, a pour fonction de transmettre la force mécanique au coude et au filament. Elle se divise en 2 parties : la tige proximale composée de FlgB, FlgC et FlgF et la tige distale composée de FlgG (Figure 40). Leur stœchiométrie a été estimée à 6, 6, 6 et 26

respectivement (Jones *et al.* 1990). Cependant, une récente étude a déterminé le nombre de FlgG à 50 (Fujii *et al.* 2017). FliE forme la jonction entre l'anneau MS et la tige (Minamino *et al.* 2000). Puis, FlgB s'assemble sur FliE suivi de FlgC et FlgF pour la tige proximale, et FlgG pour la tige distale (X. Zhao *et al.* 2013). La tige est capable de traverser la couche de peptidoglycane grâce à sa coiffe FlgJ, qui possède une activité muramidase (Hirano *et al.* 2001; Nambu *et al.* 1999; Zaloba *et al.* 2016).

La longueur de la tige semble être liée à la membrane externe. En effet, l'augmentation de la distance entre le peptidoglycane et la membrane externe *via* la manipulation de la lipoprotéine de Braun entraîne une tige plus longue (Cohen *et al.* 2017).

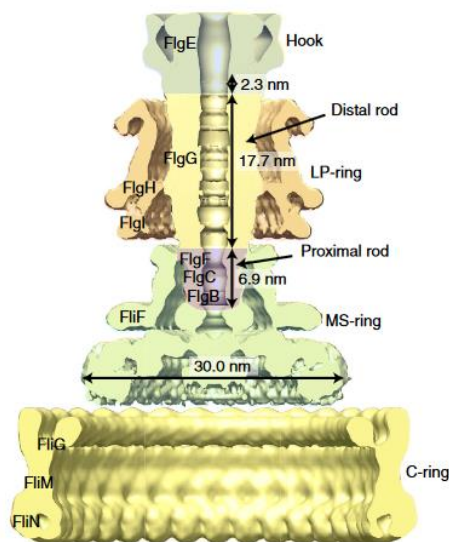


Figure 40 : Structure du corps basal comportant la tige. Section d'une carte de densité tridimensionnelle, obtenue par Cryo-EM. La tige se compose d'une tige proximale et d'une tige distale. La tige proximale mesure 6,9 nm et se compose de FlgB, FlgC et FlgF. Concernant la tige distale formée par FlgG, elle mesure 17,7 nm (Fujii *et al.* 2017)

Les anneaux P et L s'assemblent successivement autour de la tige nouvellement formée et servent d'ancrage. Ils sont respectivement composés de FlgI et FlgH sécrétés par sécrétion dépendante de Sec (Jones *et al.* 1987). Cet ensemble doit être maintenu par de très fortes interactions, car il est capable de résister à des traitements très durs, notamment acides, contrairement aux autres éléments du flagelle (Akiba *et al.* 1991).

2.1.2. Coude

Le coude joue le rôle d'un joint universel pour la transmission du couple, sa longueur chez *S. enterica* est de 55 ± 6 nm (T. Hirano *et al.* 1994). Il se compose de 120 unités d'une même protéine FlgE, qui se divise en 4 domaines D0, D_C, D1 et D2 (Shaikh *et al.* 2005). Les domaines D1

et D2 se composent de structures β , tandis que D0 est constitué des hélices N- et C-terminales (Fujii *et al.* 2009; Samatey *et al.* 2004). Chez *Campylobacter jejuni*, D_c qui n'a clairement pas encore été identifié chez *S. enterica*, est sous la forme d'un L. Il relie les domaines D0 et D1 et permet une interaction supplémentaire entre les domaines D1 renforçant la structure du coude (Matsunami *et al.* 2016).

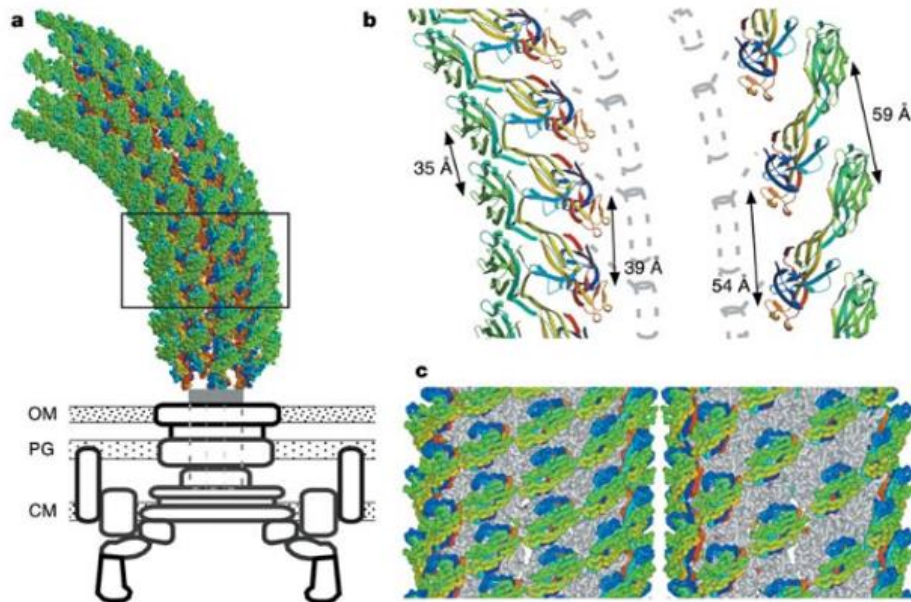


Figure 41 : Structure du coude flagellaire. (a) Modèle atomique du coude. (b) Assemblage des domaines D1 et D2 à l'intérieur de la courbure à gauche et à l'extérieur de la courbure à droite. Le canal interne est en gris. (c) Ecartement et empilement des domaines D2, les domaines D1 sont en gris. OM : outer membrane, PG : peptidoglycan, IM : inner membrane (Samatey *et al.* 2004)

L'empilement axial des domaines D1 et D2 est relativement peu important et est à l'origine de la flexibilité du coude (Figure 41) (Fujii *et al.* 2017). La courbure du coude est stabilisée par des interactions intermoléculaires électrostatiques entre unités axiales, au niveau du domaine D2 et de la boucle triangulaire du domaine D1 à l'intérieur de la courbure. L'absence de ces interactions ne remet nullement en cause la flexibilité du coude (Fujii *et al.* 2018; Sakai *et al.* 2018; Samatey *et al.* 2004). Cependant, la délétion de la boucle triangulaire du domaine D1 inhibe la polymérisation du coude. Celle-ci peut être néanmoins restaurée par des mutations sur le domaine C-terminal de FlgD (Sakai *et al.* 2018). FlgD est la coiffe du coude et posséderait le même mode d'action que la coiffe du filament (Ohnishi *et al.* 1994). Ainsi, il existerait une interaction entre la boucle triangulaire de D1 et FlgD, pour permettre un temps nécessaire à la polymérisation et éviter le relargage de FlgE dans le milieu (Sakai *et al.* 2018).

2.1.3. Jonction Tige-Coude

Le coude se forme directement sur la tige sans besoin de protéines de jonction. FlgG partage 39% d'homologie de séquence avec les domaines D0, D_C et D1 de FlgE. Ils possèdent également un assemblage et une structure tertiaire proche (Chevance *et al.* 2007; Fujii *et al.* 2017). Cependant, l'orientation du domaine D1 diffère de 7° entre les 2 structures (Figure 43). Suite à cette variation, l'interaction entre les domaines D1 des unités axiales, présente sur la tige, n'existe plus sur le coude et donne lieu à des cavités traversant les protofilaments entre les domaines D2 axiales du coude (Fujii *et al.* 2017). D'autre part, l'hélice N-terminale de FlgG possède un tour supplémentaire lui permettant un meilleur compactage entre ses unités axiales contrairement à FlgE (Fujii *et al.* 2017). Ces distinctions permettent de comprendre la différence de comportement entre la tige rigide et le coude souple. FlgG possède une séquence de 18 acides aminés appelés GSS (*FlgG specific sequence*) dans le domaine D_C, non présente chez FlgE (Chevance et Hughes 2008). Lorsque cette séquence est insérée dans le domaine D_C de FlgE, les coudes obtenus deviennent rigides empêchant notamment le rassemblement des flagelles en rotation CCW (Hiraoka *et al.* 2017). Ainsi, D_C qui n'est pas encore connu, aurait un rôle dans la flexibilité du coude, plus précisément au niveau du compactage des domaines D1 (Hiraoka *et al.* 2017).

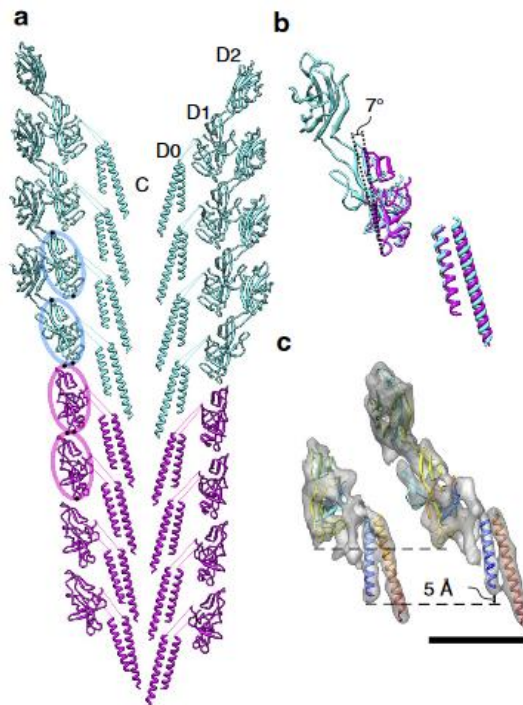


Figure 42 : Comparaison des modèles atomiques de la tige et du coude et leur assemblage axial. (a) Des interactions entre domaines D1 axiaux chez la tige et non chez le coude. (b) La superposition de FlgE et FlgG montre une différence de rotation de 7° entre leur domaine D1. (c) L'hélice α en N-terminale est plus longue de 5 Å chez FlgD que chez FlgE. En cyan le coude et en magenta la tige, C : canal central, échelle de taille 50 Å (Fujii et al. 2017)

2.1.4. Passage des unités associées au coude vers celles du filament

Il existe deux types d'unités, celles appartenant à la classe des unités associées au coude soit FlgD, FlgE et FliK et celles de la classe des unités associées au filament FlgK, FlgL, FliD et FliC. Le changement de spécificité se produit lorsque le coude a atteint une longueur bien définie (Hirano *et al.* 1994). Dans le cas d'un défaut au niveau du changement de spécificité, des phénotypes avec de longs coudes appelés « poly-coudes » apparaissent (Patterson-Delafield *et al.* 1973). Deux protéines sont au moins impliquées dans ce changement : FliK et FlhB. Une interaction entre le domaine C-terminal de FliK et le domaine C-terminal de FlhB permet le changement de spécificité.

FliK possède une région N-terminale désordonnée (FliK_N) et une région C-terminale très compactée (FliK_C) avec une queue désordonnée (FliK_{CT}) (Kodera *et al.* 2015; Minamino *et al.* 2004; Mizuno *et al.* 2011). De manière analogue à YscP homologue de FliK chez l'injectosome de *Yersinia* (Journet *et al.* 2003), l'insertion et la délétion d'acides aminés au niveau de FliK_N induit une augmentation ou une diminution de la longueur du coude d'environ 0,2 nm par acide aminé (Shibata *et al.* 2007). Ainsi, FliK peut être considéré comme une règle moléculaire du coude. FliK est sécrété de manière intermittente, dont la vitesse de sécrétion permet de déterminer la bonne taille du coude (Figure 43) (Erhardt *et al.* 2011). La sécrétion de FliK est d'autant plus rapide que les coudes sont courts. Par High-Speed AFM, la structure de FliK s'assimile à 2 boules (Kodera *et al.* 2015). Les protéines exportées à l'intérieur du flagelle sont dépliées, la re-conformation de leur domaine N- désordonné est plus ou moins rapide en fonction de la longueur du coude naissant. Ainsi, lorsque le coude atteint la bonne longueur, le temps nécessaire au re-compactage, permet de laisser suffisamment de temps pour FliK_C d'interagir avec FlhB_C (Kodera *et al.* 2015). D'autre part, les associations de FliK_N avec FlgE et FlgD sont d'autant plus importantes que le coude est long, permettant, par conséquent, de ralentir la progression de FliK dans le coude (Erhardt *et al.* 2011).

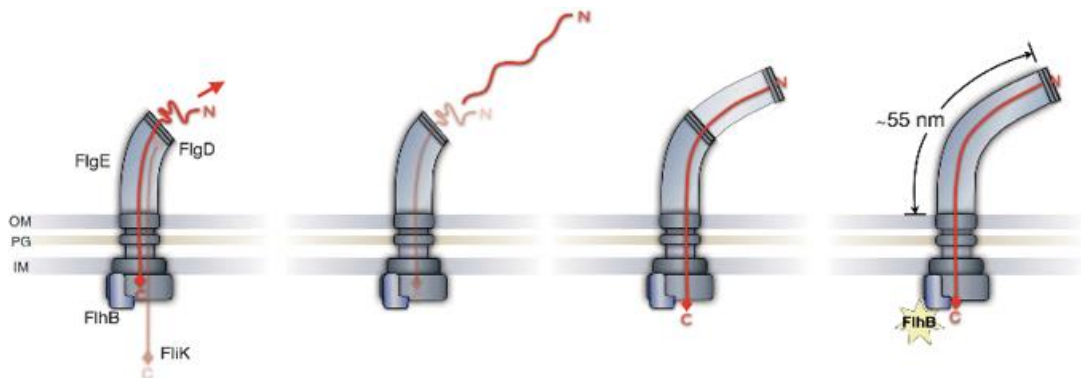


Figure 43 : Mécanisme intermittent de sécrétion régissant la taille du coude (Erhardt *et al.* 2011)

FlhB_C possède une séquence très conservée « NPTH » pour les résidus 269-270, correspondant à une boucle flexible localisée entre FlhB_{CN} et FlhB_{CC}. Le clivage auto-catalytique entre les résidus Asn-269 et Pro-270 se produit par un mécanisme de cyclisation de Asn-269 (Ferris *et al.* 2005). Celui-ci est indispensable pour le changement de spécificité, puisque la mutation Asn-269-Ala empêche l'auto-clivage de FlhB_C entraînant ainsi un phénotype polycoudes (Fraser *et al.* 2003). FliK_C interagit avec FlhB_C auto-clivé pour entraîner son réarrangement conformationnel. Les résidus 301-350 de FliK_C et les 5 derniers résidus de FliK_{CT} sont importants pour le changement de spécificité (Minamino *et al.* 2006). En particulier Val-302 et Ile-304, résidus cachés à l'intérieur de la structure compactée de FliK_C, interagissent directement avec FlhB_C grâce à l'éloignement de FliK dans le coude naissant, qui provoque le déroulement de la protéine et l'exposition de ces résidus (Kinoshita *et al.* 2017). Concernant les 5 derniers résidus de FliK_{CT}, ils pourraient assurer une conformation adéquate de FliK pour son interaction avec FlhB_C (Kinoshita *et al.* 2017).

La délétion du sous-domaine D4 de FlhA_C entraîne l'export des substrats de type filament avant la structure finale du coude (Hirano *et al.* 2009). L'interaction entre FliK_C et FlhB_C pourrait donc induire une modification de conformation chez FlhA_C, qui serait l'étape contrôlant directement le changement de spécificité des substrats (Terahara *et al.* 2018).

2.1.5. Jonction Coude-Filament

Les protéines associées au coude, FlgK et FlgL, servent d'adaptateur entre le coude et le flagelle. En effet, les domaines D1 de FlgG et FlgE sont des structures β alors qu'il s'agit d'hélices α pour FlgK, FlgL, FliC et FliD. Le domaine D1 de FlgL présente des structures très similaires à FliC, notamment le rassemblement de 4 hélices α (Hong *et al.* 2018). Le domaine D1b de FlgK interagirait avec le domaine D2 de FlgE, tandis son domaine D2 s'associerait avec la partie supérieure du domaine D2 de FlgE et aussi avec FlgL (Bulieris *et al.* 2017).

2.1.6. Filament

Le filament est une structure tubulaire hélicoïdale rigide d'environ 20 nm de diamètre et peut s'étendre jusqu'à 15 μ m à la surface cellulaire. Ce propulseur contient jusqu'à 20 000 unités d'une même protéine FliC, appelée flagelline.

Chez *S. enterica*, la flagelline se compose de 4 domaines formant une structure ressemblant à la lettre grecque capitale gamma Γ . A la manière d'une épingle à cheveux, cette structure

commence en N-terminale par D0, D1, D2, D3 puis revient à D2, D1 puis D0 en C-terminale (Figure 44A) (Yonekura *et al.* 2003). Les domaines D0 et D1 sont densément empilés entre eux et stabilisent la structure par des interactions avec les unités voisines axiales et latérales. Un canal central de 20 Å de diamètre apparaît au centre de la structure. Concernant D2 et D3, ils sont bien séparés entre chaque unité axiale et sont exposés vers l'extérieur. Ceux-ci n'existent pas au sein de la flagelline de certaines espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia pseudomallei* ne possèdent pas de domaine D3, et *Bacillus subtilis* n'a ni domaine D2, ni D3 (Nithichanon *et al.* 2015; W. S. Song, Jeon, *et al.* 2017; W. S. Song et Yoon 2014). Ces domaines variables confèrent la diversité antigénique, il existe plus de 60 sérotypes, pour exemple, chez *E. coli* (Fratamico *et al.* 2016).

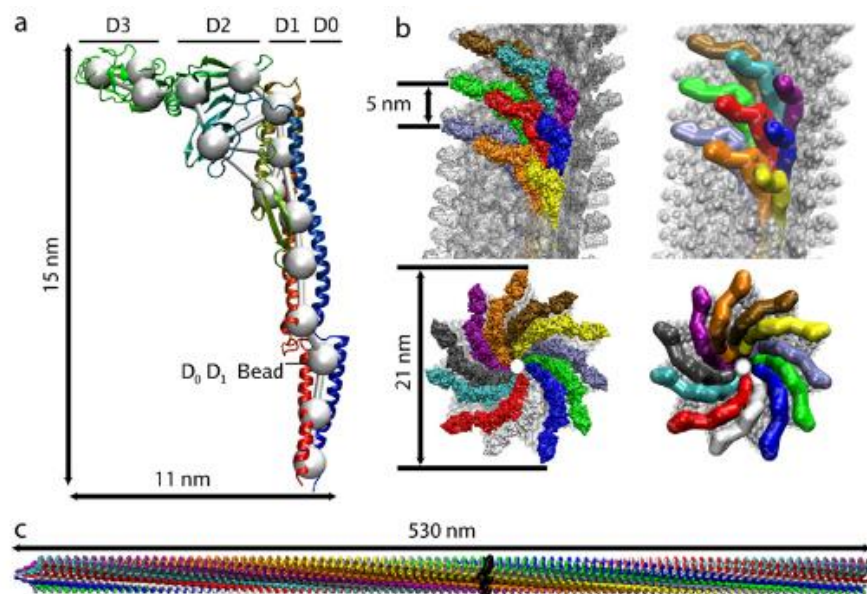


Figure 44 : Schéma du filament flagellaire en all-atom et coarse-graining. (a) Structure de la flagelline (b) Vue de côté du flagelle, positionnement des monomères de flagelline le long de la ligne hélicoïdale 5, puis vue du dessus où les 11 protofilaments sont visibles. (c) Vue de côté des 11 protofilaments de droite sur une portion. Les protofilaments sont présentés sous des couleurs différentes (Arkhipov *et al.* 2006)

Le filament peut adopter différents états conformationnels dus au polymorphisme de ses 11 protofilaments (Figure 44B-C) (Maki-Yonekura *et al.* 2010). Ces états sont des mélanges coopératifs de protofilaments dits de gauche ou de droite, les protofilaments de gauche sont plus longs de 0,8 Å que les protofilaments de droite (I. Yamashita *et al.* 1998). Ils sont directement liés à la rotation CW ou CCW et induisent la courbure du flagelle (Turner *et al.* 2000). Le domaine D1 de la flagelline serait à l'origine de ce phénomène (Vonderviszt *et al.* 1991).

Le mécanisme d'assemblage du filament a suscité de nombreux désaccords, reposant sur la variation ou non de la vitesse de croissance en fonction du temps (Hughes 2017). Initialement,

il avait été observé que la vitesse de polymérisation du filament pouvait décroître avec le temps (Iino 1974). Cette observation a été par la suite contredite en démontrant que la vitesse de polymérisation chez *E. coli* était constante (environ 13 nm/min). Cette étude s'est intéressée la reformation du filament à la base de flagelles cassés. Différents marquages fluorescents ont permis de suivre la croissance des filaments repoussants (Turner *et al.* 2012). Le mécanisme de croissance en chaîne a été alors proposé afin d'expliquer la synthèse du flagelle. Les unités interagissent *via* leur extrémités N- et C-terminales pour former une chaîne de flagelline dans le canal central du filament. La cristallisation d'une unité au niveau de la coiffe donnerait l'énergie nécessaire pour faire avancer toute la chaîne (Evans *et al.* 2013). Cependant le canal central, qui mesure 2 nm de diamètre, n'est pas suffisamment large pour une association tête à queue entre deux sous-unités voisines. De plus, ce mécanisme ne prend pas en compte l'existence de sous-unités de flagelline tronquées (Renault *et al.* 2017). Une récente étude utilisant différents marquages fluorescents pour donner lieu à des « flagelles arc-en-ciel », associés à des modèles mathématiques a permis d'identifier le mécanisme appelé injection-diffusion (Renault *et al.* 2017). Celui-ci, repose sur l'injection de la flagelline par PMF suivie de sa diffusion dans la structure naissante, la vitesse de polymérisation passant de 100 nm/min au démarrage à environ 20 nm/min (Figure 45). Ce mécanisme a été par la suite validé chez *Vibrio alginolyticus* et *E. coli* (M. Chen *et al.* 2017; Z. Zhao *et al.* 2018). Chez *E. coli*, cette vitesse est deux fois moins importante que chez *S. enterica*, et aussi plus variable. Cette fluctuation est due à des pauses observées chez *E. coli*, liées en partie à la quantité disponible de flagelline dans le cytoplasme (Z. Zhao *et al.* 2018).

the injection
diffusion model

$$L(t) = \sqrt{\left(\frac{D}{k_{on}l}\right)^2 + 2\frac{\beta D}{l}t} - \frac{D}{k_{on}l}$$

diffusion coefficient elongation increment
 secretion rate into empty filament length of monomer

Figure 45 : Mécanisme d'élongation du filament par le modèle d'injection-diffusion (Renault *et al.* 2017)

2.1.7. Coiffe du filament

La coiffe du filament FliD est indispensable pour la formation du filament, puisque les mutants $\Delta fliD$ ne produisent pas de filaments et la flagelline se retrouve dans le milieu extérieur (Homma *et al.* 1984). Cette protéine est associée au coude avec FlgK et FlgL, qui sont sécrétées avant la flagelline dans cet ordre FlgK, FlgL et FliD (Homma et Iino 1985). FliD se positionne à l'extrémité du flagelle, permettant d'éviter le relargage de la flagelline, et intervient dans sa polymérisation (Ikeda *et al.* 1993). En effet, FliD possède des domaines désordonnés à ses extrémités, qui sont responsables de son interaction avec le filament (Ikeda *et al.* 1993; Vonderviszt *et al.* 1998). Il se compose plus précisément de 3 domaines D1, D2 et D3 formant de la même manière que FliC une lettre Γ . Au niveau de la coiffe en elle-même, FliD s'organise en pentamère à la manière d'un tabouret à 5 pieds, dont D2 et D3 forment un plateau en forme d'étoile et D1 ses « pieds » (Maki-Yonekura *et al.* 2003; Postel *et al.* 2016; W. S. Song, Cho, *et al.* 2017). Chaque branche du plateau est non pas formée par un monomère, mais par deux unités adjacentes *via* une interaction entre D2 et D3 (Postel *et al.* 2016).

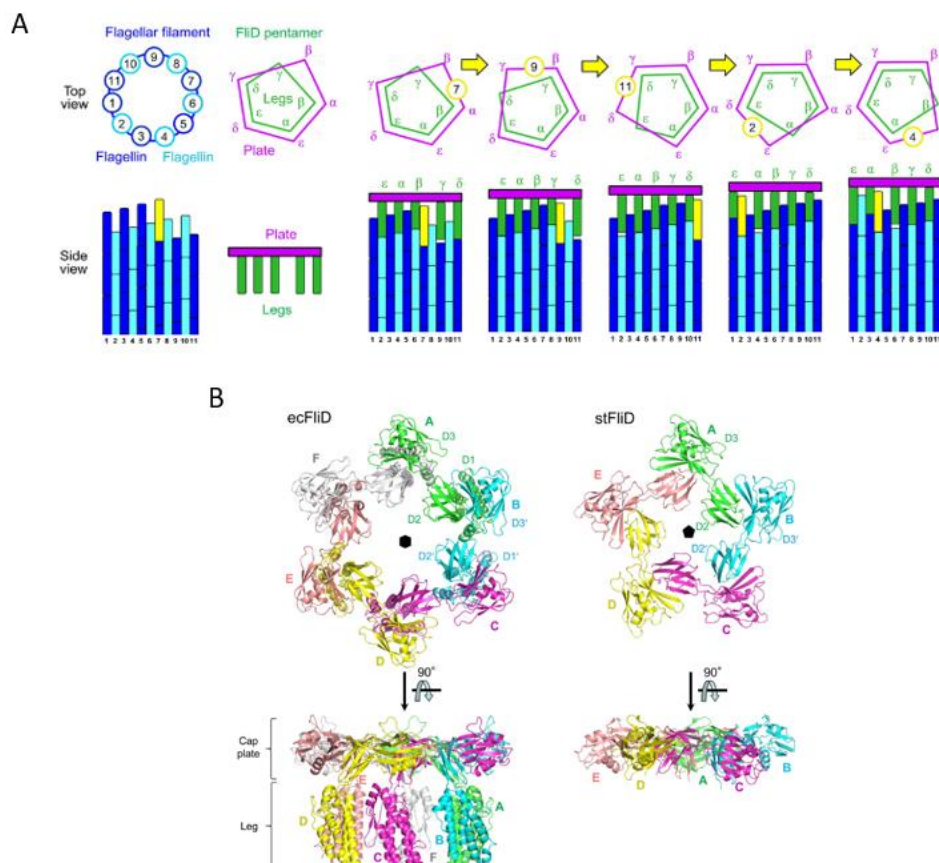


Figure 46 : Mécanisme de polymérisation de la flagelline orchestrée par la coiffe FliD et sa structure. (A) Mécanisme d'assemblage de la flagelline au niveau de FliD. La dernière protéine de flagelline ajoutée est précisée en jaune. (B) Structures cristallines de FliD chez Escherichia coli (ecFliD) formant un hexamère et chez Salmonella enterica formant un pentamère (stFliD), les domaines D1 chez stFliD n'ont pas été cristallisés. Chaque monomère FliD est exprimé d'une couleur différente montrant l'implication de deux monomères pour chaque branche (W. S. Song, Cho, et al. 2017)

Lorsque la coiffe est enfouie dans le filament, une cavité visible en forme de L semblerait être l'emplacement de la flagelline suivante prête à être exportée (Yonekura *et al.* 2000). Les « pieds » de la coiffe présentent de fortes similitudes structurales avec les domaines D0 et D1 de la flagelline mais aussi avec FlgL (W. S. Song, Cho, *et al.* 2017). Ainsi, chaque « pied » se positionne entre deux unités de flagelline, conduisant à un espace entre elles. Cependant à cause de l'asymétrie entre les 5 « pieds » et les 11 protofilaments du flagelle, un « pied » doit adopter une conformation différente qui entraîne un double espace. Cet espace plus large permet l'incorporation d'une nouvelle unité de flagelline déplaçant, dans le sens contraire des protofilaments, le « pied » voisin et ainsi de suite (Maki-Yonekura *et al.* 2003; Yonekura *et al.* 2000) (Figure 46A).

Le nombre de sous-unités de FliD varie d'une espèce bactérienne à l'autre (Figure 46B). Par exemple, la coiffe chez *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* est un hexamère, tandis que c'est tétramère chez *Serratia marcescens* (Cho *et al.* 2017; Postel *et al.* 2016; W. S. Song, Cho, *et al.* 2017). Chez cette dernière, ce nombre plus faible entraîne une organisation plus étroite et de ce fait, une interaction supplémentaire entre les domaines D2 voisins. Connaissant le nombre de protofilaments et l'oligomérisation de FliD chez *S. enterica*, une règle a été introduite permettant de relier ces deux caractéristiques : $2N+1 = \text{nombre de protofilaments}$, où N est le nombre de sous-unités de FliD (Cho *et al.* 2017). La caractérisation du nombre de protofilaments chez *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* permettra de valider cette hypothèse.

3. Assemblage et variabilité du flagelle sous contrôle des gènes

Chez *S. enterica* et *E. coli*, plus de 60 gènes sont nécessaires pour l'assemblage et le fonctionnement du flagelle (J. Frye *et al.* 2006). Ils forment le régulon flagellaire qui se divise en 3 classes selon leur hiérarchie transcriptionnelle, dépendant de l'assemblage et de l'environnement du flagelle (Figure 47A) (Kutsukake *et al.* 1990; Macnab 1992).

3.1. Assemblage coordonné et sa régulation

La classe I contient l'unique opéron *flhDC* avec 2 gènes *flhD* et *flhC*, qui forment le complexe FlhD₄C₂ promouvant l'action du facteur sigma 70 (σ^{70}) pour activer l'expression des gènes de classe II (X. Liu et Matsumura 1994). Cette classe comporte principalement des gènes impliqués dans la structure du corps basal avec la tige suivie du coude. Lorsque ce dernier atteint la taille

adéquate, le facteur sigma 28 (σ^{28}) déclenche la transcription de la troisième classe de gènes incluant les protéines associées au coude, la coiffe du filament puis la flagelline, mais aussi les protéines associées au *chemosensing*, notamment MotA, MotB et CheY. σ^{28} est transcrit à partir du gène *fliA*. Jusqu'à l'achèvement du corps basal et du coude, celui-ci est séquestré par l'anti- σ^{28} FlgM (Ohnishi *et al.* 1992; Sorenson *et al.* 2004). A l'achèvement du coude, FlgM est sécrété vers l'extérieur, libérant ainsi σ^{28} qui active la dernière classe de gènes (Figure 47B) (Karlinsky, Tanaka, *et al.* 2000). σ^{28} en facilitant la sécrétion de FlgM, s'apparente à une chaperonne (P. D. Aldridge, Karlinsky, *et al.* 2006).

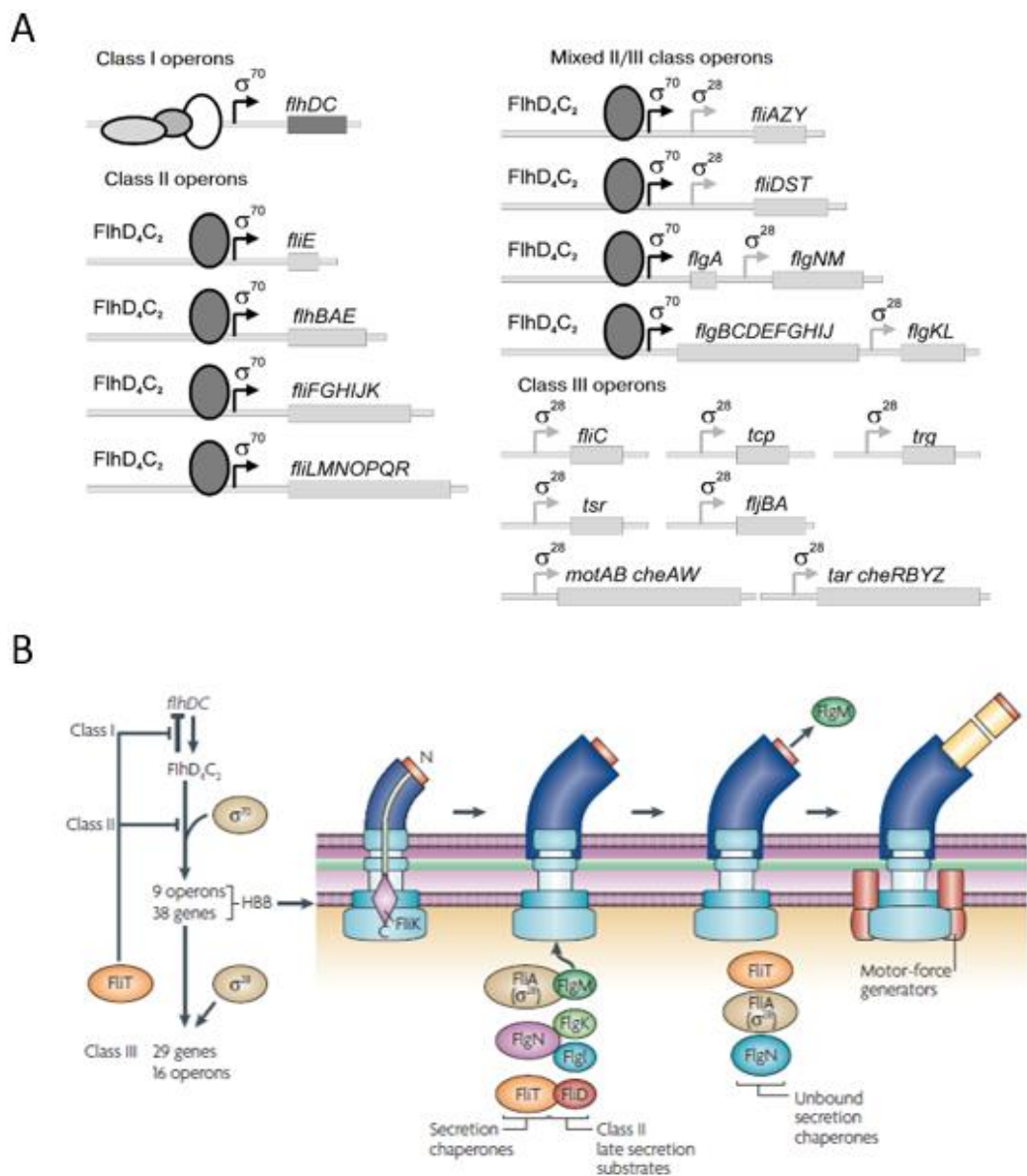


Figure 47 : Assemblage coordonné du flagelle par le régulon flagellaire. (A) Opérons selon leur classe (Osterman *et al.* 2015). (B) Couplage de la régulation des gènes avec l'assemblage du flagelle (Chevance et Hughes 2008)

Les chaperonnes FliT, FliS et FlgN, en plus de protéger et d'amener leur substrat à l'appareil d'export, jouent un autre rôle dans la régulation de l'expression des gènes (Chevance et Hughes 2008). Un élément critique dans cette régulation reste la balance entre σ^{28} et FlgM. FlgN augmente la traduction de FlgM de classe III (Karlinsky, Lonner, *et al.* 2000), tandis que FliS empêche la sécrétion de FlgM (Galeva *et al.* 2014; Xu *et al.* 2014). En particulier, FliS permettrait de prévenir la dégradation et la sécrétion de FlgM, en attendant la transcription de *fliA* qui se produit après celle de *flgM* (Galeva *et al.* 2014; Kalir *et al.* 2001). FliT agit en tant que régulateur négatif des opérons de classe II (Kutsukake *et al.* 1999). Le gène *fliT* appartient à l'opéron *fliDST* transcrit à partir des promoteurs de classe II et classe III. FliT se lie au complexe FlhD₄C₂ *via* FlhC, empêchant ce complexe de s'associer au promoteur de classe II. Il possède donc une fonction de facteur anti-FlhD₄C₂ (Yamamoto et Kutsukake 2006). En revanche lorsque le complexe FlhDC est déjà lié à l'ADN, celui-ci est insensible à la régulation de FliT (Claret et Hughes 2000). Il y aurait donc un chevauchement entre les sites de liaison avec FliT et l'ADN (C. Aldridge *et al.* 2010). D'autre part, FliT en formant le complexe ClpX-FlhD₄C₂-FliT améliore sélectivement la dégradation de FlhC par la protéase ClpXP (Yoshiharu Sato *et al.* 2014).

3.2. La flagelline dans tous ses états

La flagelline peut subir chez certaines espèces des modifications post-traductionnelles ou des variations de phase.

Les flagellines glycosylées sont obtenues par ajout de glycanes au niveau des domaines exposés de la flagelline, par catalyse d'une glycosyltransférase. La glycosylation est principalement de type N au niveau du groupement amide des résidus d'asparagine, ou de type O pour le groupement hydroxyle des résidus de sérine et thréonine (Hayakawa et Ishizuka 2012). La glycosylation des flagellines d'*Acidovorax avenae* et *Burkholderia cenocepacia* leur permet de ne pas être détecté, respectivement par les récepteurs FLS2 et TLR5 (Hirai *et al.* 2011; Hanuszkiewicz *et al.* 2014). Elles échappent ainsi au système immunitaire de l'hôte, car la flagelline est reconnue par le récepteur TLR5 chez les animaux et FLS2 chez les plantes par le biais de flg22, un peptide bien conservé de la flagelline (Felix *et al.* 1999). Chez *Pseudomonas ssp.*, l'absence de glycosylation de la flagelline impacte la virulence, même chez les phytopathogènes tels que *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, où la glycosylation a un rôle d'éliciteur (Taguchi *et al.* 2010; Arora *et al.* 2005). En revanche chez *Campylobacter jejuni*, la glycosylation de type O de la flagelline est indispensable pour la formation du filament et la motilité (F. Y. Y. Tan *et al.* 2015).

Un autre type de modification post-traductionnelle est associé à *S. enterica*, qui arbore un flagelle méthylé (Ambler et Rees 1959). *fliB* appartient aux gènes de classe 2 du régulon flagellaire et code pour une méthylase FliB qui catalyse la ϵ -N-méthylation des résidus de lysine (J. Frye *et al.* 2006). FliB n'a ni d'effets sur la motilité, ni d'effets significatifs sur le *swarming*, et a donc un rôle supposé dans la virulence (Deditius *et al.* 2015). D'après une récente analyse génomique, les modifications post-traductionnelles, aussi bien la glycosylation que la méthylation, sont très répandues au sein des entérobactéries. En effet, les gènes impliqués dans la glycosylation de la flagelline ont été retrouvés sur plusieurs entérobactéries, telles que *Plesiomonas* ou *Cedecea*. De plus, des orthologues de *fliB* ont été identifiés chez certaines espèces de *Yersinia*, *Enterobacter*, *Franconibacter* et *Pantoea* (De Maayer et Cowan 2016).

La variation de phase est bien connue chez *S. enterica*, et permet d'alterner entre deux types de flagellines FliC et FljB (Lederberg et lino 1956). FljB est codé par l'opéron *fljBA*, qui produit également FljA, un répresseur de FliC. La variation de phase est contrôlée par un site de recombinaison de l'ADN, par le biais de la recombinase Hin (Figure 48) (P. D. Aldridge, Wu, *et al.* 2006). Le promoteur de l'opéron *fljBA* se situe dans cette zone, donc lorsque FljA est produit, il inhibe l'expression de FliC. En revanche, à partir du moment où le promoteur est inversé, FljA n'est plus produit et l'expression de FliC peut avoir lieu. En plus d'aider à échapper au système immunitaire, l'une ou l'autre flagelline donne des avantages différents, FliC permet de coloniser davantage les cellules épithéliales, tandis que FljB octroie à la bactérie un temps de propulsion plus long (Horstmann *et al.* 2017). La variation de phase sur la flagelline a également été décrite chez *E. coli* (B. Liu *et al.* 2012).

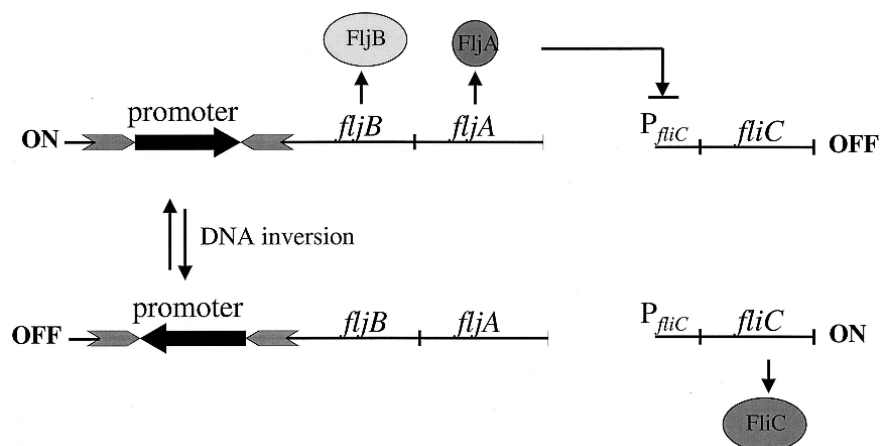


Figure 48 : Représentation schématique au niveau des gènes du fonctionnement de la variation de phase chez *Salmonella enterica* (Bonifield et Hughes 2003)

Matériels et Méthodes

I. Liposomes

1. Matériels et précautions

L'ensemble des lipides provient soit de Sigma-Aldrich, ou soit de Polar Avanti, dans le cas contraire la provenance est indiquée.

Toute la verrerie en contact avec les liposomes est nettoyée au préalable par un mélange sulfochromique pendant au moins 30 minutes. Ce mélange correspond à 4% (v/v) d'une solution saturée en bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_4$) dans de l'acide sulfurique concentrée (v/v). La verrerie est ensuite rincée 4 fois avec de l'eau MilliQ, séchée à l'étuve, puis stockée dans des récipients fermés à l'abri de la poussière.

Pour les lames et lamelles en verre, qui sont celles typiquement utilisées en microscopie, elles sont tout d'abord dégraissées avec de l'éthanol absolu, avant utilisation du mélange sulfochromique. De même en fin de nettoyage, elles ne sont pas placées à l'étuve, mais rincées dans de l'éthanol absolu frais, puis séchées sous flux d'azote pour éviter les traces d'eau après séchage.

Le tampon HEPES, utilisé avec les liposomes, se compose de 20 mM d'HEPES (acide N-2-hydroxy-éthylpipérazine N'-2-éthanesulfonique) et 150 mM de NaCl à pH 7,4. Ce tampon est préparé toutes les semaines et est toujours filtré avant utilisation sur membrane poreuse avec une taille de pores de 0,22 μ m (Unité de filtration 250 mL, Corning®).

2. Formation des GUVs

Les Vésicules Géantes Unilamellaires (GUV, pour *Giant Unilamellar Vesicle*) sont préparées d'après la méthode d'hydratation douce assistée par gel (Weinberger *et al.* 2013). Dans un premier temps, une solution aqueuse à 5% (w/v) d'alcool polyvinylique (PVA, pour *polyvinyl alcohol*) (w/v) avec 280 mM de sucrose est préparée, après dissolution du PVA sous forte agitation à 95°C. Pour les essais avec l'agarose standard et l'ultra-low melting agarose, des solutions à 1% (w/v) ont été utilisées. Des lamelles en verre ultrapropres sont placées et laissées 10 min sous ozone (UV/Ozone ProCleaner™, Bioforce Nanosciences) pour supprimer les potentielles contaminations organiques et permettre un meilleur étalement du PVA sur le verre. Ainsi, 200 μ L de la solution de PVA sont étalés sur l'ensemble de chaque lamelle, à l'aide d'un cône de pipette autoclavé. Les lamelles sont déposées sur une plaque chauffante à 50°C, le temps du séchage complet du polymère, typiquement 30 minutes. Deux dépôts de 5 μ L d'une solution

chloroformique de lipides à 3 mg/mL, réalisés au centre des lamelles sont étalés à l'aide d'une aiguille stérile, jusqu'à observation de l'évaporation du solvant. L'opération est renouvelée trois fois, puis les lamelles sont placées 1 h sous vide de manière à enlever les traces résiduelles de solvant. Un puits est ensuite collé sur chaque lamelle en formant un joint externe avec de la colle Araldite® (Huntsman Advanced Materials), en prenant garde qu'il n'y ait pas de contact entre cette colle et la future solution interne. Un volume de 500 µL d'HEPES est ajouté par puits, permettant l'hydratation des bicouches lipidiques superposées. Après une heure, les GUVs sont récoltées et sont soit stockées à 4°C ou transférées dans un autre puits non hydraté, ce qui permet de concentrer les GUVs sans avoir recours à une étape d'ultracentrifugation.

3. Formation des autres liposomes

Les autres liposomes de plus petites tailles sont obtenus par extrusion. Tout d'abord, une solution chloroformique de lipides est séchée sous forme de film, à l'aide d'un flux d'azote, puis celui-ci est laissé sous vide pendant 2 h pour enlever les traces de solvant. Le film est ensuite réhydraté et remis en suspension par vortex, jusqu'à atteindre la concentration désirée de lipides. La suspension de systèmes lipidiques multilamellaires obtenue est extrudée grâce à un extrudeur manuel à doubles seringues (Liposofast, Avestin Inc), contenant une membrane en polycarbonate poreux et dont les pores sont de diamètre contrôlé (Figure 49). La suspension subit 25 passages à travers ce filtre, afin d'homogénéiser les tailles des liposomes. Les liposomes d'une taille de 400 nm et 1 µm ont été obtenus à partir de pores de diamètre 400 nm, alors que des pores de diamètre 5 µm ont été utilisés pour les liposomes de 2 µm. Cependant pour les liposomes ne contenant pas de chaînes d'ancrage PEG greffées aux lipides, une étape de sonication supplémentaire a été indispensable pour atteindre un diamètre de 400 nm, à la suite de l'étape d'extrusion sur pores de même diamètre. L'amplitude de la sonde à ultrasons (Ultrasonic Processor Vibra Cell, Sonic Materials) a été réglée à 20% et l'échantillon a subi 2 min 30 d'ultrasons.

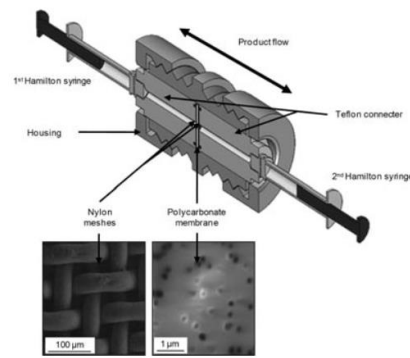


Figure 49 : Fonctionnement d'une extrudeuse Liposofast. Un passage correspond à l'extrusion du contenu de la seringue dans un sens (Joseph et Bunjes 2012)

4. Mesure de la taille et du potentiel zêta

Pour les liposomes ayant un diamètre supérieur à 1 µm, la taille a été déterminée par observation en microscopie à épifluorescence, en mesurant les tailles sur des images contenant au minimum un total de 250 objets (pour le marquage des liposomes, voir III.1). En revanche pour une même localisation, plusieurs profondeurs de champs sont réalisées de manière à saisir aussi bien les petits liposomes, que les plus grands.

Pour les liposomes dont la taille est inférieure à 1 µm, leur taille a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic light scattering*) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Cette technique repose sur la variation d'intensité de diffusion de la lumière en fonction du temps. En effet, les petites particules étant soumises au mouvement brownien, leur déplacement entraîne des changements d'intensité de diffusion plus réguliers que pour des particules de plus grandes tailles. Cette fréquence, propre à la taille des particules, permet d'obtenir le coefficient de diffusion transversale D_t , et par la suite le diamètre hydrodynamique des particules D_h , d'après l'équation de Stokes-Einstein ci-dessous (1) :

$$(1) D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Les autres paramètres sont connus : la constante de Boltzmann k_B , la température T et la viscosité η . La distribution des tailles, et donc la polydispersité de l'échantillon, est également obtenue à l'aide d'algorithmes.

L'appareil Nano ZS permet aussi de déterminer le potentiel zêta des liposomes. Il correspond au potentiel électrostatique régnant au diamètre hydrodynamique d'une particule, qui délimite autour de cette dernière, la couche d'ions immobiles due à des interactions

électrostatiques fortes, de la couche d'ions mobiles se diffusant autour de ce diamètre. Une fois la mobilité des particules déterminée à partir du champ électrique E appliqué et de la vitesse des particule v calculée, l'application du modèle de Smoluchowski donne accès au potentiel zêta ζ , d'après l'équation (2) avec une constante diélectrique ϵ et une viscosité du milieu η connues (Sze *et al.* 2003).

$$(2) \zeta = \frac{\eta \mu_e}{\epsilon} \text{ avec } \mu_e = \frac{v}{E}$$

II. Bactéries

1. Souches bactériennes utilisées

Tableau 2 : Récapitulatif des souches bactériennes utilisées durant cette étude, avec leur description et leur provenance. ST pour Salmonella enterica Typhimurium et O157:H7 correspond à un sérotype d'Escherichia coli entérohémorragique (EHEC).

Désignation dans le manuscrit	Description	Source
O157:H7 WT	TUV 93-0 (Dérivée toxines Shiga négative de la souche EDL933)	(Campellone <i>et al.</i> 2004)
O157:H7 $\Delta fliC$	TUV 93-0 $\Delta fliC$	Eliza Wolfson
O157:H7 $\Delta motA$	TUV 93-0 $\Delta motA$	Eliza Wolfson
ST WT	SL1344 WT	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST $\Delta flgKL$	SL1344 $\Delta hin-5717::FRT$ ($fliCON$) $\Delta flgKL5739::FKF$	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST $\Delta motAB$	SL1344 $\Delta motAB::tetra$	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST $FliC$ ON	SL1344 $\Delta hin-5717::FRT$ ($fliCON$)	(Horstmann <i>et al.</i> 2017)
ST $FliB$ ON	SL1344 $\Delta hin-5718::FRT$ ($fliBON$)	(Horstmann <i>et al.</i> 2017)
ST $\Delta fliB$	SL1344 $\Delta fliB8191$	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST $\Delta flgKL\Delta fliB$	SL1344 $\Delta hin-5717::FRT$ ($fliCON$) $\Delta fliB8191$ $\Delta flgKL5739::FKF$	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST $\Delta motAB\Delta fliB$	SL1344 $\Delta fliB8191$ $\Delta motAB::tetra$	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)

ST FliC ON $\Delta fliB$	SL1344 $\Delta fliB8191 \Delta hin-5717::FRT$ (<i>fliCON</i>)	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST FljB ON $\Delta fliB$	SL1344 $\Delta fliB8191 \Delta hin-5718::FRT$ (<i>fljBON</i>)	(Horstmann <i>et al.</i> 2019)
ST "Marquage du flagelle"	LT2 $\Delta hin-5717::FRT$ <i>fliC6500</i> (T237C)	(Paradis <i>et al.</i> 2017)

2. Culture et motilité

Les différentes souches d'EHEC O157:H7 et de ST ont été cultivées dans le milieu de culture LB (Lysogeny broth) (Sigma Aldrich). Il contient 1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5% de NaCl (w/v). Généralement, les bactéries sont cultivées toute une nuit à 37°C à 100 rpm, pour prévenir la rupture de flagelles. La motilité est vérifiée sur milieu de motilité, composé de 1% de tryptone, 0,33% d'agar et 0,4% de NaCl (w/v).

Pour toutes les expériences suivantes, cette culture est centrifugée à 2 000 g pendant 15 minutes à 20°C (Allegra 64R, Beckman coulter). Le culot bactérien est resuspendu dans le même tampon que les liposomes, à savoir le tampon HEPES, et est ajusté à une concentration finale de 10^8 UFC/ml.

3. Flagelle et flagelline

3.1. Extraction de flagelles

Une préculture, de quelques dizaines de millilitre de LB est préparée durant 24 h à 37°C à 200 rpm. Cette préculture, est transférée le jour suivant dans de plus grands volumes de culture, typiquement 10 L. Cette fois-ci, la culture est agitée sous 80 rpm pour garantir la préservation du plus grand nombre de flagelles. Les bactéries sont ensuite collectées par une centrifugation à 3 000 g durant 15 min à température ambiante (Avanti J-16XP, Beckman Coulter), puis resuspendues doucement dans un minimum d'eau MilliQ. Cette suspension bactérienne concentrée est placée dans un bécher sous agitation mécanique durant une heure, de manière à casser les flagelles de la surface des bactéries grâce la rotation du barreau aimanté.

Ensuite, le contenu du bécher est dilué jusqu'à 40 mL avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*), puis centrifugé à 5 000 g à 4°C pendant 1h (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Le tampon PBS contient 137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 et de KH_2PO_4 avec un pH de 7,4. Le surnageant, qui contient les flagelles, est conservé tandis que l'opération est renouvelée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de culot visible. Une fois les surnageants regroupés, du sulfate

d'ammonium est ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 40% (w/v). Après agitation et dissolution complète, les échantillons sont placés à 4°C toute une nuit, le temps de la précipitation des flagelles. Le lendemain, ceux-ci sont récupérés avec les mêmes paramètres de centrifugation que précédemment, les culots sont repris dans un minimum de PBS, typiquement quelques millilitres, et stockés à -18°C.

3.2. Obtention de la flagelline

La flagelline est obtenue à partir de flagelles par traitement chimique acide. Pour ce faire, de l'acide chlorhydrique à 1 M est ajouté jusqu'à obtenir un pH de 2. Le mélange est neutralisé une heure plus tard, par ajout d'une solution de NaOH à 1 M.

3.3. Purification et concentration des échantillons de flagelle ou flagelline

Les échantillons sont dialysés de manière à éliminer la présence résiduelle de sels, notamment le sulfate d'ammonium utilisé précédemment pour la précipitation des flagelles. Une membrane de dialyse en cellulose, ayant un seuil de rétention de 14 kDa, est réhydratée dans une solution d'EDTA à 0,5 M pH 8 durant 15 min à ébullition. L'EDTA est un agent chélatant permettant de capter les cations divalents, servant à la conservation de la tubulure de dialyse. Après plusieurs rinçages à l'eau MilliQ, la tubulure est conservée dans une solution d'EDTA à 5 mM.

Les échantillons de flagelle ou de flagelline ne représentant que quelques millilitres sont dialysés contre 1 L d'eau MilliQ. Après une nuit, le tampon de dialyse est changé, puis les échantillons dialysés sont récupérés en fin de journée.

Tout le solvant aqueux est ensuite éliminé par lyophilisation (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ). Puis, les échantillons sont repris dans le tampon souhaité et au volume adéquat pour obtenir la concentration désirée.

3.4. Vérification de la pureté par électrophorèse SDS-PAGE

Les échantillons sont mélangés dans du tampon Laemmli 2X, composé de 20% de glycérol (v/v), 4% de SDS (w/v), 10% de β -mercaptoéthanol (v/v) et 0,02% de bleu de bromophénol (w/v) dans du tampon 125 mM Tris/HCl pH 6,8. Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Les gels de séparation et de concentration ont été préparés selon les formules ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition des gels de séparation et de concentration utilisés pour le SDS-PAGE

	Acrylamide/ bis-acrylamide 30 %	SDS 5% (w/v)	APS 10% (w/v)	TEMED	Tris-HCl 1,5M pH 8,8	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	Eau MilliQ
Gel séparation (12%)	2 mL	6,25 µL	50 µL	5 µL	1,3 mL		1,639 mL
Gel concentration (4%)	402 µL	37,5 µL	30 µL	3 µL		750 µL	1,778 mL

Une échelle de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards #1610377, Bio Rad) a également été utilisée. Après dépôt, les échantillons migrent dans du tampon dénaturant Tris-glycine SDS pH 8,3 (0,25 M Tris, 1,92 M glycine et 0,1% SDS (w/v)) à voltage constant, avec une intensité pour 1 gel de 25 mA dans le gel de concentration, contre 35 mA dans le gel de séparation. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (0,05% Bleu de Coomassie Blue R-250 (w/v), 10% acide acétique glacial (v/v), 40% éthanol (v/v) et 50% eau miliQ (v/v)), puis décoloré (10% acide acétique glacial (v/v), 40% éthanol (v/v) et 50% eau miliQ (v/v)) jusqu'à l'apparition des bandes de protéines.

3.5. Dosage protéique par BCA

Pour déterminer la quantité de flagelle ou de flagelline, le dosage protéique par acide bicinchonique (BCA, pour *bicinchoninic acid*) a été utilisé (Kit dosage, Sigma Aldrich). Le réactif est composé à 1,96% en volume d'une solution contenant des ions cuivre Cu^{2+} et d'une autre solution contenant du BCA avec un pH à 11,25 à 98,04% en volume. Lors du dosage, les protéines réduisent les ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} dans un milieu alcalin, puis cet ion forme un complexe avec 2 molécules de BCA de couleur pourpre. Ce dernier possède une absorption maximale à 562 nm, et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine de sérum bovin (BSA, pour *bovine serum albumin*) à 1 mg/mL, dans le même tampon que celui dans lequel se trouve l'échantillon à doser (Figure 50). Pour le dosage, 2 mL du réactif sont ajouté à 100 µL d'échantillon. Après agitation, les échantillons sont incubés pendant 30 min à 37°C, puis l'absorbance à 562 nm est lue (Spectromètre Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies).

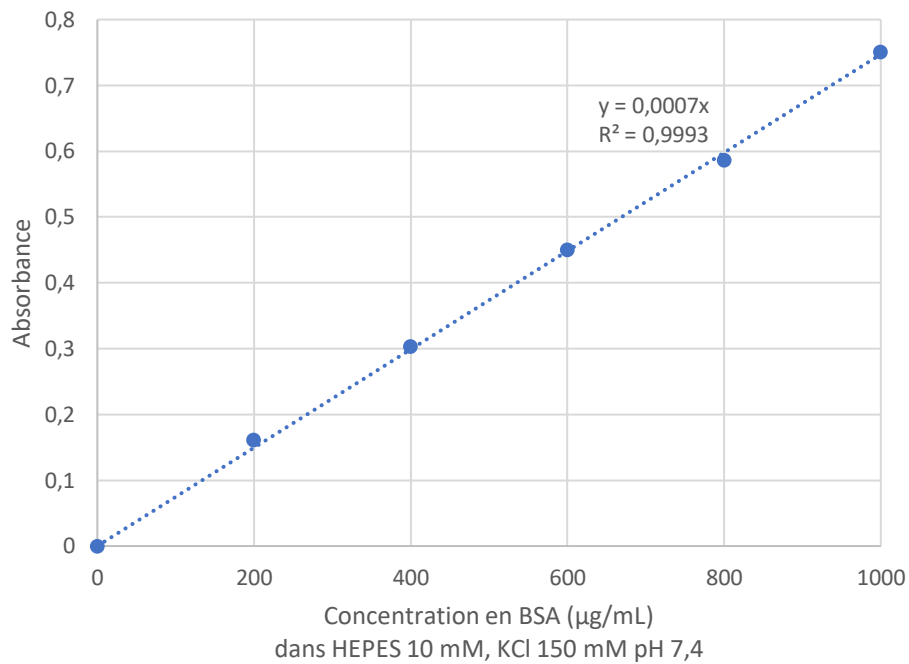


Figure 50 : Courbe d'étalonnage du dosage protéinique par BCA à partir d'une gamme étalon de BSA

III. Microscopie à épifluorescence

L'observation en microscopie à épifluorescence a été faite grâce à un microscope inversé Leica DMI6000 B. Le montage entre la lamelle, préparée de différentes manières par la suite, et la lame est scellé à l'aide d'espaceurs de Parafilm fondu, permettant le maintien de la lamelle même en inversé (Figure 51). Pour ce faire, le montage est placé sur une plaque chauffante à 120°C pendant 10 secondes seulement.

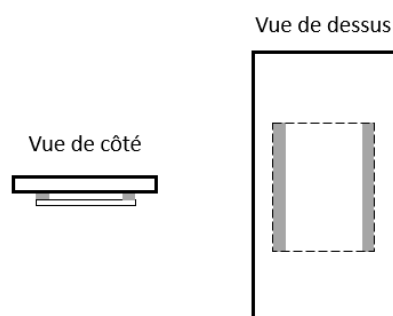


Figure 51 : Montage microscope scellé avec du Parafilm, représenté en gris

1. Marquage et immobilisation des liposomes

Pour visualiser les liposomes par microscopie à épifluorescence, un fluorochrome couplé à un lipide NBD-PE (Invitrogen™) a été ajouté dans la solution chloroformique de lipide à un ratio

de 2% molaire. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du NDB-PE sont respectivement de 463 nm et 536 nm.

Différentes méthodes d'immobilisation des liposomes, et ainsi différentes surfaces d'adsorption, ont été testées pour prévenir leur fusion sur le verre :

- Or oxydé. Dans un premier temps, l'or est déposé sur une lamelle en verre grâce à un système de chambre à vide, dans laquelle le dépôt de métaux se fait par sublimation (Edwards model Auto 306). 1 nm de chrome suivi de 10 nm d'or sont déposés sur la surface de verre, le chrome servant de couche d'accroche à l'or. Les lamelles d'or sont ensuite placées dans un UV/ozoneur (UV/Ozone ProCleaner™, Bioforce Nanosciences) durant 10 minutes, ce qui permet de créer une couche superficielle d'or oxydé. Après montage du système lame/lamelle, la solution de GUVs peut être déposée et les GUVs visualisées.
- Couplage sur or via une liaison covalente amide. Les lamelles d'or sont assemblées au préalable avec les lames, puis laissées toute une nuit dans une solution de cystéamine hydrochloride à 0,06% (w/v) dans l'éthanol absolu, afin de former une monocouche autoassemblée d'aminoalkyls sur la surface. Les montages sont ensuite rincés avec 5 volumes équivalents à l'inter-espace entre lame et lamelle, soit environ un total d'1 mL d'éthanol absolu, puis séchés sous flux d'azote. En parallèle, un mélange équivolume d'EDC à 0,1 M et NHS à 0,4 M est ajouté à la suspension de GUVs. Le volume de suspension employé est de 2,93 µL, de manière à avoir 50 µg EDC/cm². L'ensemble de ce mélange est déposé sur les lamelles et laissé au repos pendant 1 h, qui correspond au temps d'immobilisation des liposomes. Ensuite, 67 µL d'éthanolamine à 200 mM pH 8, correspondant à 1/3 du volume de l'inter-espace, est ajouté, puis incubé 10 minutes de manière à bloquer les sites non occupés par les liposomes. Pour finir, le montage est trempé à l'horizontal dans du tampon HEPES durant 20 minutes, avant d'observer les liposomes.
- Caséine. Une solution à 3 mg/mL de caséine isolée de lait de vache a été insérée dans le montage et laissée pendant 5 minutes. Après plusieurs rinçages à l'eau MilliQ, les GUVs sont ajoutées et observées par microscopie (Witkowska *et al.* 2018).
- Or nu. 3% massique de DSPE-PEG-PDP sont incorporés dans la solution chloroformique des lipides, utilisée pour la formation de liposomes. Cette molécule permet l'ancrage des liposomes directement par liaison covalente des molécules de soufre avec l'or.

Pour l'observation de l'interaction des bactéries avec les GUVs, elles sont incubées au préalable 1 h avec les bactéries directement dans le montage ou très souvent dans un récipient séparé, puis transféré dans le montage.

2. Marquage des flagelles

10 mL de LB Broth ont été inoculés avec la souche ST « Marquage du flagelle ». Après 24 h de culture, une centrifugation est réalisée à 2 500 g pendant 3 min (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Le culot bactérien est repris dans 2 mL de tampon HEPES, puis 2 μ L d'une solution stock de 10 mM d'Alexa Fluor™ 594 C5 Maleimide (Invitrogen™) sont ajoutés. L'ensemble est incubé dans le noir pendant 30 min. Deux nouvelles étapes de centrifugation, cette fois-ci durant 2 min, sont effectuées pour éliminer le surplus de fluorochrome. Le culot final est solubilisé dans 1 mL d'HEPES. Au microscope à épifluorescence, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du fluorochrome Alexa Fluor™ 594 sont respectivement de 588 nm et 612 nm.

IV. Mesure de l'adhésion bactérienne sur liposomes

La mesure de l'adhésion bactérienne sur liposomes est réalisée dans des plaques 6 puits. Les lames de verre sont découpées manuellement aux dimensions de 1,9 x 2,5 cm, à l'aide d'une pointe diamant et nettoyées comme décrit précédemment (voir I.1), puis recouvertes d'or (voir III.1). Les lames d'or sont placées dans chaque puits sur un piédestal de 3 mm, découpé sur un cône de pipette au niveau du côté le plus large.

Les liposomes sont préparés en parallèle par ajout de 3% massique de DSPE-PEG-PDP (Avanti polar) dans la solution chloroformique, car ce lipide est indispensable pour l'immobilisation covalente des liposomes sur l'or. Ensuite, 1 mL d'une solution de liposomes à 5 μ g/mL est déposé de manière homogène sur l'ensemble de la surface d'or. Après 1 h, 10 mL de tampon HEPES sont ajoutés doucement sur le côté de la lame, de manière à immerger tout le puits et à pouvoir enlever également le piédestal. Puis les liposomes non immobilisés sont éliminés en prélevant 8 mL dans chaque puits, ce qui permet de laisser un volume minimal de tampon pour garder la lame d'or immergée.

Pour exposer les liposomes immobilisés aux bactéries, 5 mL d'une solution bactérienne dans le tampon HEPES à 10^8 UFC/mL (voir II.2) sont ajoutés, l'incubation dure 1 h. L'excès de

bactéries est enlevé par prélèvement de 5 mL et les bactéries non adhérentes sont détachés des liposomes en ajoutant 8 mL de tampon HEPES. L'ensemble du tampon présent dans les puits est ensuite éliminé par aspiration. 1 mL de PBS est ajouté dans les puits vidés et cette fois-ci les bactéries adhérentes sont détachées vigoureusement par aspiration-refoulement directement sur la surface d'or, afin de détruire les liposomes et libérer les bactéries attachées. Les échantillons sont dilués en série et déposés sur milieu de culture LB agar, sur lequel les bactéries seront dénombrées le jour suivant. Tous les tests d'adhésion ont été réalisés à 23 ± 2 °C, exceptés lorsque la température est précisée. Ce qui est le cas notamment pour le DOPC ($\Delta 9$ -*Trans*), où la plaque 6 puits est placée dans une chambre thermostatique au cours de l'incubation entre les bactéries et les liposomes.

V. Techniques basées sur la fluorescence

Pour les mesures de fluorescence, le spectrophotomètre Cary Eclipse (Agilent, anciennement Varian) a été utilisé pour chacune des techniques citées ci-dessous.

1. Polarisation généralisée du Laurdan

La variation de l'ordre lipidique a été évaluée par polarisation généralisée d'une sonde fluorescente, appelée Laurdan (6-Dodecanoyl-N,N-diméthyl-2-naphthylamine). Une solution stock de 1 mM de Laurdan dans le DMSO est ajoutée à la suspension de liposomes, dans le but d'avoir un ratio de 20 molécules de phospholipides pour une sonde Laurdan. Ce mélange est incubé dans le noir pendant 30 minutes, puis est dilué dans du tampon HEPES jusqu'à une concentration finale de 5 μ M pour le Laurdan et 100 μ M pour les phospholipides. Pour le flagelle, des quantités croissantes ont été progressivement ajoutées au mélange Laurdan/liposomes. A chaque addition de flagelles, un temps d'incubation de 20 min dans le noir est appliqué avant de réaliser la mesure. La polarisation généralisée (GP) du Laurdan a été calculée d'après les intensités d'émission à 440 nm et 490 nm, suivant une excitation à 390 nm, selon l'équation suivante (3) :

$$(3) \quad GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (\text{Parasassi } et \text{ al. } 1990)$$

2. Mesure de l'hydrophobicité grâce à la sonde Prodan

L'hydrophobicité d'une surface protéique, ici des flagelles, a été mesurée selon le protocole modifié de Kato and Nakai, en utilisant la sonde fluorescente Prodan (N,N-Diméthyl-6-propionyl-2-naphthylamine) (Kato et Nakai 1980). Une solution stock de 1 mM de Prodan dans du DMSO est utilisée, 8 μ L sont ajoutés successivement à des échantillons contenant 1 mL de flagelles dilués dans du tampon HEPES. Après homogénéisation en pipettant, les échantillons sont incubés dans le noir pendant 10 minutes et l'intensité relative de fluorescence est relevée à 465 nm, la longueur d'onde d'excitation étant de 365 nm. La standardisation a été faite par le biais de la BSA. Les valeurs de surface d'hydrophobicité (S_o) ont été déterminées au moins deux fois de manière indépendante, contenant cinq concentrations différentes de flagelles, dont la moyenne de chacune provient de trois répétitions techniques.

3. Anisotropie

L'anisotropie du Laurdan et du Prodan a été utilisée pour déterminer la fluidité des bicouches de lipides en fonction de la température (Marczak 2009). Ces sondes sont ajoutées à la solution chloroformique de lipides avant la formation du film lipidique. Le volume ajouté de la solution mère 1 mM de sonde est calculé de manière à obtenir un ratio molaire de 40:1, respectivement des lipides et du Prodan. Par la suite, le protocole de formation des liposomes, ayant un diamètre de 2 μ m, est identique à celui décrit dans la partie précédente (voir I.3). La suspension de liposomes est ensuite diluée dans une cuve de quartz, avec du tampon HEPES pour obtenir une concentration finale de 200 μ M en lipides et 5 μ M de sonde. Si besoin, l'échantillon est chauffé 30 min à la température souhaitée dans un bain marie avant la mesure de l'anisotropie. La valeur d'anisotropie r est calculée à partir de l'équation ci-dessous (4), et est directement donnée par le logiciel du spectrophotomètre :

$$(4) \quad r = \frac{I_0 - GI_{90}}{I_0 + 2GI_{90}} \quad \text{avec} \quad G = \frac{I_{90}}{I_0}$$

I_0 correspond à l'intensité mesurée par le polariseur en position parallèle à l'excitation, alors que I_{90} désigne l'intensité mesurée par un autre polariseur, cette fois-ci en position perpendiculaire. G est un facteur correctif totalement dépendant du spectrophotomètre, et qui correspond au ratio entre les deux intensités d'émission précédentes et permet de prendre en compte la différence de sensibilité de l'appareil entre les polariseurs.

4. Relargage de carboxyfluorescéine

Une solution de 5(6)-carboxyfluorescéine (CF) (Sigma-Aldrich) à 50 mM est préparée dans du tampon salin HEPES. Cette solution est utilisée comme tampon d'hydratation pour les films de lipides, en vue de préparer des suspensions de liposomes à 2 μm , de concentration lipidique 1 mg/mL. Ceci permet l'encapsulation de la CF à l'intérieur des liposomes. L'excès de CF est ensuite éliminé par deux ultracentrifugations successives à 200 000 g pendant 1h30 à 4°C (Beckman Coulter Optima L-100 XP). Le surnageant est éliminé à chaque étape et est remplacé par du tampon ne contenant pas de CF. Le dernier culot est resuspendu dans un volume donné de tampon HEPES, afin d'obtenir une concentration finale en lipides de 2,5 mg/mL.

La dilution des liposomes contenant la CF est optimisée à chaque fois de manière à obtenir un signal important, tout en ne dépassant pas le seuil de saturation du détecteur du spectrophotomètre. Une suspension bactérienne à 10^8 UFC/mL dans du tampon HEPES est ajoutée à 1 mL de suspension de liposomes diluée, afin d'atteindre une concentration finale en bactéries dans la cuve de 10^6 UFC/mL. Sachant qu'à haute concentration, la fluorescence de la CF est éteinte, une fuite de CF hors du lumen des liposomes va conduire à son *déquenching*. Les sondes émettent à nouveau et leur fluorescence peut alors être suivie par mesure de l'intensité d'émission à 512 nm, par excitation à 492 nm. Les valeurs d'émission sont mesurées juste avant d'ajouter la suspension bactérienne, puis une heure après. Pendant l'expérience, les échantillons sont placés à l'abri de la lumière et sur un agitateur à bascule à faible vitesse, pour simplement éviter la sédimentation des bactéries non motiles et des liposomes. A la fin de l'expérience, tous les liposomes sont lysés après ajout de Triton X-100 à une concentration de 1% (v/v). Ceci permet de mesurer l'intensité maximale de fluorescence correspondant au relargage de toute la CF. Grâce à cette intensité maximale, le pourcentage de fuite en % est calculé, de manière à normaliser les résultats entre les échantillons.

VI. Méthodes de quantification lipidique

1. Dosage de Stewart

Le dosage de Stewart permet de quantifier les phospholipides de manière simple et rapide, grâce à la formation d'un complexe coloré entre les phospholipides et le ferrothiocyanate d'ammonium (Stewart 1980). Il a été utilisé seulement pour le dosage de la phosphatidylcholine, étant donné que certains lipides ne peuvent pas être dosés, comme le phosphatidylglycérol.

Dans un tube à essai, 2 mL de chloroforme sont ajoutés à la suspension de liposomes, l'ensemble est vortexé durant 30 s pour faire passer les lipides de la phase aqueuse à la phase organique. 1 mL du réactif de Stewart, qui se compose de 2,7% de chlorure ferrique hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et de 3% de thiocyanate d'ammonium (NH_4SCN) (w/v) dans de l'eau, est ajouté et mis en contact avec les lipides en vortexant pendant 1 min. Pour faciliter la séparation de phase, une centrifugation est réalisée à 470 g pendant 4 min à 4°C (5430 R, Eppendorf), la température basse permet de prévenir l'évaporation du solvant. La phase supérieure aqueuse est retirée, puis la phase organique est une nouvelle fois centrifugée. Celle-ci est finalement dosée à 488 nm (Spectromètre Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies), l'absorbance du complexe coloré étant proportionnelle à la quantité de phospholipides. La courbe étalon a été réalisée avec des solutions chloroformiques d'egg-PC (nom commercial pour un mélange de phosphatidylcholines extrait d'œuf) ayant une concentration connue, et dont le chloroforme a été préalablement évaporé sous flux d'azote (Figure 52).

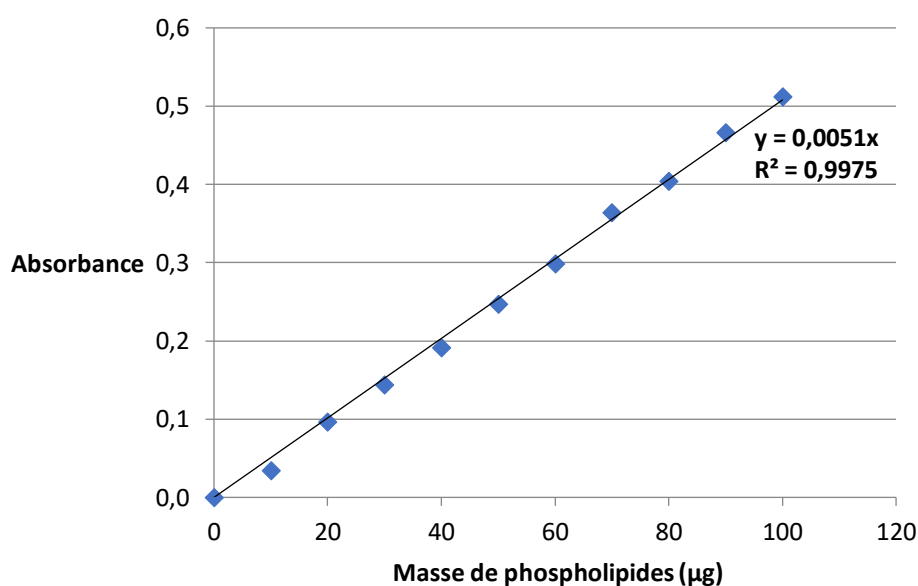


Figure 52 : Courbe d'étalonnage du dosage de Stewart à partir d'une gamme étalon d'egg-PC

2. LC-MS

2.1. Extraction lipidique

Les lipides ont été extraits d'après une méthode modifiée de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer 1959). Pour ce faire, 375 µL d'un mélange de chloroforme/méthanol (2:1, v:v) contenant 1 mM de BHT (*butylated hydroxytoluene*) ont été ajoutés à 100 µL d'une solution aqueuse contenant les lipides. Le mélange a été vortexé durant 10-15 min puis, après ajout de 125 µL de chloroforme,

est à nouveau vortexé pendant 1 min. 125 μ L d'eau sont ensuite introduits, suivi d'une rapide centrifugation de 5 s. La phase organique inférieure est collectée, séchée sous azote à température ambiante et stockée à -20°C . Cette extraction a permis de récupérer et concentrer les lipides provenant des cellules HT29 (voir VIII.2), mais également de purifier les lipides des GUVs pour s'affranchir de l'excès en sucrose avant les analyses en RMN (voir VI.4).

2.2. Analyse LC-HRMS²

La quantification des lipides a été réalisée par chromatographie haute résolution couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-HRMS², pour *Chromatography/High Resolution tandem Mass Spectrometry*). Les lipides sont au préalable dissous dans 200 μ L d'isopropanol. La chromatographie liquide (LC) a été réalisée d'après un protocole modifié d'Ulmer et ses collaborateurs (Ulmer *et al.* 2017). Une HPLC 1290 (Agilent Technologies) avec une colonne C18 Hypersil Gold (100 x 2,1 mm, 1,9 μ m, Thermofisher) à 50°C a été utilisée. La phase mobile se compose de 60:40 (v/v) acétonitrile:eau avec 10 mM de formate d'ammonium et 0,1% d'acide formique (solvant A) et 90:8:2 (v/v) isopropanol:acétonitrile:eau avec 10 mM de formate d'ammonium et 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient se déroule comme suit pour le solvant A :

- 0–2 min, 68%
- 2–8 min, 60%
- 8–10 min, 55%
- 10–16 min, 50%
- 16–22 min, 40%
- 22–28 min, 30%
- 28–35 min, 20%
- 35–40 min, 0%.

La colonne a été équilibrée pendant 6 min avec 68% de solvant A. Le débit a été réglé à 0,25 mL/min et avec un volume d'injection de 2 μ L. Les analyses LC-HRMS² ont été achevées en couplant le système LC à un spectromètre de masse Agilent 6538 (Agilent Technologies), un hydride quaternaire temps de vol (QToF, pour *quadrupole time-of-flight*). Le spectromètre de masse est équipé d'une double ionisation électrospray (ESI, pour *electrospray ionization*). La température de la source, le fragmenteur, le deuxième orifice (*skimmer*) sont respectivement réglés à 350°C , 150 V, 65 V. L'acquisition est réalisée en mode balayage complet entre 100 m/z

et 1700 m/z, avec un scan de 2 spectres par seconde. Les ions parents sélectionnés sont fragmentés avec une énergie de collision fixée à 35 eV. Les scans ont été réalisés sur les six ions les plus intenses. Deux références internes de masse ont été utilisées pour la calibration in-run du spectromètre de masse (121.0509, 922.0098 en mode ion positif et 112.9856, 1033.9881 en mode ion négatif). Le logiciel MassHunter B.07 permet le contrôle des paramètres de la machine, en plus de l'acquisition et du traitement des données. Les spectres de masse ont été acquis aussi bien en mode ion positif, que négatif.

2.3. Traitement des données et annotation

Les fichiers Agilent générés (*.d) sont convertis au format *.mzXML en utilisant MSConvert (Chambers *et al.* 2012). Les données des fichiers *.mzXML ont été traitées à l'aide de MZmine 2 v2.37 (Pluskal *et al.* 2010). Le niveau de bruit était $2 \cdot 10^3$ pour MS1 et 0.10^0 pour MS2 en centroïde. Le générateur de chromatogramme a été utilisé avec un intervalle de temps minimum de 0,10 (min), un minimum de hauteur de $1 \cdot 10^3$ et une tolérance m/z de 5 ppm. La déconvolution du chromatogramme a été effectuée avec un algorithme de minimisation de recherche locale. Le seuil chromatographique était de 30,0% ; le minimum de recherche dans la plage des temps de rétention (RT) était de 0,05 min, avec une hauteur relative minimale de 5% et un ratio minimum de haut/bord pic de 2. La plage de durée du pic varie de 0,05 à 3 min. Les balayages MS2 ont été effectués avec une plage de tolérance de m/z de 0,05 Da et une plage de tolérance RT de 0,1 min. Les isotopologues ont été groupés en utilisant l'algorithme groupeur des pics isotopiques avec une tolérance m/z de 0,008 et une tolérance RT de 0,3 min. Une étape d'alignement de pic a été réalisée en utilisant le module d'alignement (tolérance m/z = 0,008, poids pour m/z = 50, poids pour RT = 50, tolérance absolue de RT 2 min). Le module de recherche de pic a été utilisé avec une tolérance d'intensité de 10%, une tolérance m/z de 0,008 et une tolérance de temps de rétention de 1,0 min. La liste des pics obtenus a été ensuite filtrée en utilisant un module de filtre des listes de pics avec un pic minimal dans une ligne de 2, un pic minimal dans un modèle d'isotope de 2 et en gardant seulement les pics du balayage MS2 (GNPS). La liste des pics a ensuite été exportée au format *.csv à l'aide du module "Exporter au fichier CSV". De plus, un *.mgf a été exporté en utilisant le module : "export pour/soumis au GNPS". La liste des pics a été annotée grâce à une combinaison de 4 bases de données, GNPS (M. Wang *et al.* 2016), lipid blast (Kind *et al.* 2013), lipid match (Koelmel *et al.* 2017) and lipiDex (Hutchins *et al.* 2018). Les pics non annotés ont été éliminés.

3. GC-FID

3.1. *Transméthylation et libération des acides gras*

Les suspensions de liposomes sont au préalable lyophilisées (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ) durant une nuit. Au lyophilisat sont ensuite ajoutés :

- 1 mL d'une solution à 5% d'acide sulfurique concentrée dans le méthanol (v/v)
- 50 µg de BHT
- 20 µg de triheptadécanoïne C17:0 TAG (Sigma Aldrich), en tant qu'étalon interne
- 300 µL de toluène, comme co-solvant.

L'ensemble est vortexé durant 30 s, puis chauffé à 90°C pendant 1h30, durant lesquelles la réaction de transméthylation se produit. Après refroidissement à température ambiante, 1,5 mL de NaCl à 0,9% (w/v) et 1 mL d'hexane sont ajoutés pour extraire les esters méthyliques d'acides gras (FAME, pour *Fatty Acid Methyl Ester*). Les flacons sont secoués vigoureusement et centrifugés rapidement pour faciliter la séparation des phases. La phase supérieure organique est transférée dans un nouveau tube et évaporée sous flux d'azote. Finalement, l'ensemble des FAMES est récupéré avec 50 µL d'hexane, en pipettant plusieurs fois.

3.2. *Détermination de la quantité d'acides gras*

Un GC-2010 PLUS (Shimadzu) est équipé d'une colonne polaire de type DB23 et d'une injection en mode split 1:40. L'injecteur et le détecteur à ionisation de flamme ont été réglés à une température de 260°C. Concernant la température du four, celle-ci est programmée à 150°C pendant 3 minutes, puis avec une augmentation de 10°C par minute jusqu'à 240°C, qui est ensuite maintenue pendant 5 minutes.

Avant les échantillons, un FAME 37 est injecté de manière à connaître et à attribuer un RT à chaque FAME, connaissant les 37 FAMES de ce mélange. L'étalon interne C17:0 TAG permet de relier l'aire des pics à une masse d'acides gras. Par conséquent, la quantité totale pour chaque acide gras est réappropriée à chaque lipide, en fonction de leur composition en acide gras, et de leur proportion dans le mélange lipidique.

4. RMN ¹H

Les lipides sont extraits au préalable par une méthode modifiée de Bligh et Dyer (voir VI.2.1). Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker 400 MHz Avance III, équipé d'une sonde multi-noyaux liquide (BBFO, pour *Broad Band Fluoreine Optimized*) 5 mm. Toutes les

expériences ont été réalisées à température ambiante. Les programmes standard Bruker ont été utilisés (zg30, 2 s de temps d'acquisition, largeur spectrale de 20 ppm, 5 s de délai de relaxation). Au total, le signal est enregistré sur 3 096 points d'acquisition, ce qui conduit à une durée d'enregistrement de 6 heures par spectre. Après traitement des données, phasage, correction de ligne de base, l'aire des pics est déterminée par intégration. Le ratio molaire de chaque lipide est calculé à partir des valeurs relatives des intégrales, selon 3 méthodes :

- à partir des rapports des intégrales de signaux isolés de chaque lipide du mélange
- à partir de deux signaux superposés ayant des rapports d'intégrales différents au sein d'un même composé, notamment le rapport avec les protons éthyléniques
- à partir d'un signal isolé et d'un signal superposé, l'intégrale du signal isolé est calibrée exactement au nombre de protons impliqués, permettant d'obtenir une intégrale du signal superposé prépondérée par la composition du mélange.

VII. Simulation moléculaire dynamique et corrélation

Dans chaque système, 128 molécules de lipides au total sont placées dans une boîte d'hydratation. Pour chaque mélange, un ratio de 38:26 pour lipide étudié:POPC a été utilisé pour chaque monocouche, pour créer le contenu lipidique désiré de 60:40. 150 mM de NaCl d'ions ont été ajoutés pour neutraliser le système et atteindre les concentrations physiologiques. Les systèmes sont minimisés, puis simulés pour 500 ns à 293,15 K, avec un barostat semi-isotrope appliqué dans la direction xy à l'aide du logiciel Amber, en utilisant les champs de force lipid17 pour les lipides et tip3p pour les ions et l'eau. Les derniers 200 ns de chaque simulation ont été évalués.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant une version 3.6.1 et une version 1.2.1, respectivement des logiciels R et R studio. Les matrices de corrélation avec différentes propriétés de la membrane et les adhésions bactériennes correspondantes sont développées en utilisant la librairie R "Hmisc". Une matrice du coefficient de corrélation de Pearson (PCC) a été calculée pour toutes les paires de colonnes possibles d'une matrice. PCC mesure la corrélation linéaire entre deux variables données. Suivant le modèle de Cauchy-Schwarz pour l'inégalité, la corrélation a une valeur comprise entre +1 et -1, où +1 est une corrélation totale positive linéaire, 0 est une corrélation non linéaire et -1 est une corrélation totale négative (Aldaz *et al.* 2015). La visualisation graphique de la matrice de corrélation a été générée en utilisant les progiciels "corrplot" and "PerformanceAnalytics".

VIII. Quantification de l'adhésion bactérienne *in vitro*

1. Culture cellulaire HT29

Les cellules cancéreuses coliques HT29 ont été obtenues à partir de collection américaine de culture de tissus (ATCC, pour *American Tissue Culture Collection*). La lignée cellulaire a été maintenue à 37°C dans 5% CO₂, dans un milieu McCoy modifié avec :

- 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (30 minutes à 56°C)
- 2 mM L-glutamine
- 1% streptomycine/pénicilline.

Les cellules ont été utilisées entre les passages 15 et 20. Elles ont été cultivées sur des boîtes de 24 puits, à une concentration de $4 \cdot 10^4$ cellules par puits, dont le milieu de culture a été changé tous les jours.

2. Incorporation des acides gras et adhésion bactérienne

Des solutions mères à 200 mM d'acides gras palmitique (C16:0) et linoléique (C18:3) sont préparées dans l'éthanol absolu. Après 3 jours de culture cellulaire, les solutions d'acides gras sont diluées dans le milieu de culture, pour atteindre une concentration finale de 100 µM. Au préalable, le milieu de culture a été renouvelé 1 à 2 heures avant.

Les cellules ont incorporé la plus grande quantité d'acides gras après 6 h de culture sur des cellules non confluentes (Habermann *et al.* 2009). Une journée après l'introduction des acides gras, le surnageant est éliminé et $2 \cdot 10^7$ bactéries contenues dans 250 µL de PBS sont ajoutés. L'incubation dure 30 min à 37°C dans l'étuve à cellules eucaryotes. Puis, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS, puis traitées et décollées avec de la trypsine-EDTA. Suite aux dilutions successives, les échantillons sont déposés sur LB agar pour dénombrement bactérien.

IX. Résonance Plasmonique de Surface

1. Liaison avec une bicouche lipidique

L'affinité de la liaison entre la flagelline H7 et une bicouche de phosphatidylcholine a été mesurée en déterminant la constante de dissociation K_D de l'interaction, par spectrométrie de résonance plasmonique de surface (SPR) grâce à un banc optique en configuration de Kretschmann (Rossi *et al.* 2003). Une bicouche de phosphatidylcholine supportée et découplée

du support est formée par couplage amide entre une surface d'or recouverte d'une monocouche de cystéamine et un lipide d'ancrage. Le lipo-polymère d'ancrage utilisé ici est le DSPE-PEG₃₄₀₀-NHS, il est constitué d'un lipide DSPE, sur la tête polaire duquel est couplé un poly(éthylène)glycol de 77 unités, lui-même lié à un ester N-hydroxysuccinimide (NHS).

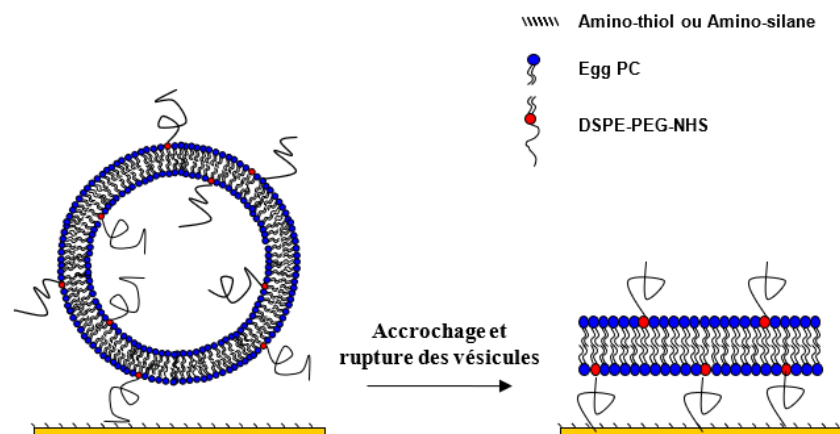


Figure 53 : Schéma de formation de la bicouche décollée du support par des chaînes PEG. Les vésicules composées d'egg-PC ou POPC et de DSPE-PEG₃₄₀₀-NHS s'ancrent sur la surface fonctionnalisée présentant des amines primaires à la surface. La déstabilisation de vésicules conduit à la formation de la bicouche supportée sur pilotis de PEG (le schéma n'est pas représentatif de la densité de PEG).

La formation de la bicouche supportée est schématisée Figure 53. Des vésicules d'egg-PC contenant la molécule d'ancrage à 5% massique (suspension de vésicules à 1 mg/mL dans du tampon HEPES) sont déposées sur la surface fonctionnalisée. La molécule d'ancrage se lie au support d'or fonctionnalisé, puis la déstabilisation spontanée des vésicules aboutit à la formation d'une bicouche. Au préalable, les vésicules ont été formées par extrusion par passage à travers une membrane ayant des pores de 50 nm de diamètre. Egalement, la surface en verre est recouverte de 2 nm de chrome, puis de 47 nm d'or (pour le dépôt d'or, voir III.1). La bicouche formée est décollée de 3-4 nm de la surface d'or grâce aux chaînes PEG des lipides d'ancrage (Rossi *et al.* 2007).

En SPR, la grandeur mesurée et exploitable est la réflectivité. Le profil de réflectivité obtenu en fonction de l'angle du faisceau laser incident pour une couche de chrome de 2 nm et d'or de 47 nm est le suivant (Figure 54) :

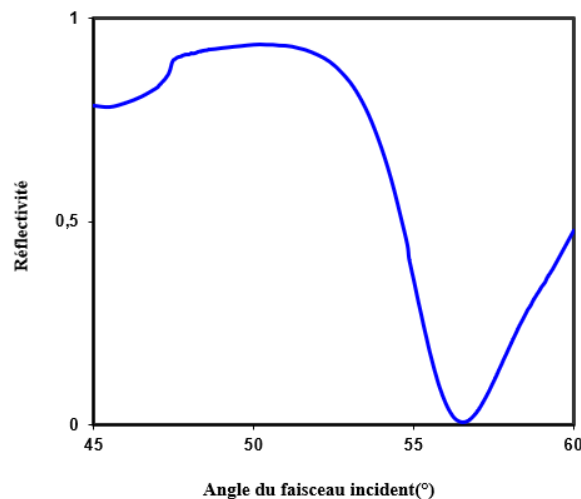


Figure 54 : Spectre SPR de la réflectivité en polarisation TM et pour une longueur d'onde de 633 nm et un montage prisme en LaSFN9 ($n=1,85$) sur une lame de verre ($n=1,514$), 2 nm de chrome et 47 nm d'or vaporisé. Le milieu diélectrique a un indice de réfraction de 1,33. Le pic d'absorption est dû à la résonance plasmonique de surface.

Quand la réflectivité est minimale, cela signifie que l'énergie est absorbée par le métal et qu'il y a excitation des plasmons. En effet, la résonance des plasmons de surface peut être considérée comme une oscillation collective du métal à l'interface entre ce métal et le milieu diélectrique, qui se traduit par une chute de la réflectivité du métal due à un transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde de surface à l'interface diélectrique/métal. Un pic d'absorption localisé autour de l'angle de résonance est alors observé. Il existe une épaisseur du film métallique qui permet d'optimiser la résonance du plasmon. Les meilleurs résultats sont obtenus pour une épaisseur d'or de 47 nm, où toute l'énergie incidente est absorbée au niveau de l'interface et la réflectivité devient nulle.

Les variations de l'angle minimum de ce pic d'absorption vont permettre de quantifier les perturbations se produisant près de l'interface. Les épaisseurs optiques des couches de molécules interagissant avec la surface métallique sont déterminées grâce au logiciel Winspall (Max-Planck Institute for Polymer Research, Mayence, Allemagne), dont le fonctionnement se base sur la résolution des équations de Fresnel. Les permittivités nécessaires au calcul de l'épaisseur des couches additionnelles sont :

- pour la couche de chrome : $\epsilon_{Cr} = -3,12 + i 9,7$, (domaine de variation autorisé pour la modélisation : permittivité réelle de -3,12 à -6,3 et permittivité imaginaire : de 18,3 à 9,7)
- pour la couche d'or $\epsilon_{Au} = -12,7 + i 1,4$ (domaine de variation autorisé pour la modélisation : permittivité réelle de -12,7 à -9 et permittivité imaginaire : de 1,4 à 1,8).
- la permittivité du diélectrique qui est le tampon de travail, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4 est de 1,78.

- la valeur de la permittivité est de $\epsilon=2,25$ pour les couches de phospholipides et pour les protéines.

Une courbe de réflectivité de référence, réalisée avant l'interaction des molécules avec la surface dans le tampon de travail, est tout d'abord modélisée grâce au logiciel Winspill. La détermination de l'épaisseur optique d'un film mince de permittivité connue est réalisée par incrémentation de l'épaisseur, due à la nouvelle couche additionnelle jusqu'à ce que la courbe modélisée se superpose à la courbe de réflectivité de référence, réalisée après l'interaction des molécules avec la surface dans le même tampon de travail. L'épaisseur optique donnée par le logiciel est exprimée en Å. Pour déterminer la quantité de protéines ou de lipides liés aux constructions, l'épaisseur optique est convertie en ng/mm^2 , 10 Å correspondent à 1 ng/mm^2 (Knoll 1998). La sensibilité du dispositif présenté ici est de 1 Å, soit 10 ng/cm^2 .

Plusieurs concentrations de flagellines croissantes jusqu'à 5 mM ont été injectées sur la bicouche supportée. L'interaction a été suivie durant 1 h et la quantité de protéines ayant interagi avec la bicouche est évaluée, lorsque la courbe d'interaction atteint un plateau. Le calcul du K_D a été réalisé avec le logiciel PRISM.

2. Liaison avec la G-actine

L'évaluation de la constante de dissociation K_D de l'interaction entre la G-actine et la flagelline a été réalisée grâce à un Biacore T100 (GE Healthcare). La G-actine (AKL95, Cytoskeleton Inc.) a été préparée selon les recommandations du fabricant, puis a été immobilisée sur une puce CM5 Séries S (GE Healthcare), qui se compose d'une matrice de dextran carboxyméthylé attaché de manière covalente à une surface d'or. L'immobilisation de 3 500 RU de G-actine s'est faite par couplage amine sur une des quatre pistes, selon la procédure suivante :

Produit injecté	Débit	Durée
Mélange équivolume de : <ul style="list-style-type: none"> - N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0,1M - 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) à 0,4 M 	10 $\mu\text{L}/\text{min}$	10 min
G-actine à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dans du tampon acétate de sodium à 10 mM pH 4 avec : <ul style="list-style-type: none"> - 0,2 mM chlorure de calcium (CaCl_2) - 0,2 mM d'adénosine triphosphate (ATP) 	5 $\mu\text{L}/\text{min}$	15 min
Ethanolamine 1 M pH 8,5	10 $\mu\text{L}/\text{min}$	7 min

Une autre piste a été préparée, comme ci-dessus mais sans l'injection de G-actine. Le rôle de cette piste contrôle est de soustraire l'effet du tampon, qui provoque une augmentation du signal qui n'est pas due à la liaison avec le ligand.

L'affinité de la flagelline H7 avec la G-actine a été mesurée grâce à une méthode type de l'appareil, qui mesure les cinétiques d'association et de dissociation. Cette méthode a été programmée avec les paramètres suivants :

Produit injecté	Débit	Durée
Flagelline H7	20 $\mu\text{L}/\text{min}$	800 s
Tampon d'élution contenant : <ul style="list-style-type: none"> - 10 mM HEPES 7,4 - 150 mM KCl - 0,02 mM CaCl_2 - 0,02 mM ATP - 0,001% Tween-20 	20 $\mu\text{L}/\text{min}$	700 s
NaOH à 10 mM	5 $\mu\text{L}/\text{min}$	24 s
NaOH à 10 mM	5 $\mu\text{L}/\text{min}$	24 s

Plusieurs cycles de flagelline avec des concentrations croissantes de 0,25 à 200 μM ont été réalisés à 25°C. Pour préparer la gamme de concentration, la solution mère de flagelline H7 a été diluée avec le tampon d'élution. Entre chaque cycle, une étape de régénération comprenant deux injections de NaOH est nécessaire pour décrocher toute la flagelline liée, de manière à ce que le cycle suivant se fasse sur une surface identique au cycle précédent. Au final, l'ensemble des réponses de liaison à l'équilibre pour chaque concentration est tracé, puis un modèle d'affinité à l'état d'équilibre pour un complexe 1:1 est tracé, donnant accès à la constante de dissociation K_D .

Résultats et Discussion

I. Avant-propos

L'objectif de ce travail de thèse a été, tout d'abord, de confirmer l'existence d'une interaction entre le flagelle bactérien et les phospholipides de la membrane plasmique et d'identifier les principaux paramètres mis en jeu. L'interaction du flagelle bactérien avec des phospholipides provenant de la membrane plasmique de plante a été précédemment étudiée par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), ainsi qu'*in planta* (Rossez *et al.* 2014). Cette étude a permis de démontrer l'interaction du flagelle d'*Escherichia coli* Entérohémorragique (EHEC) O157:H7 sur les lipides de la membrane. L'hypothèse suggérée en conclusion de ce travail est que cette adhésion repose sur une interaction électrostatique entre le flagelle et les têtes polaires des phospholipides, étant donné que seuls les lipides testés non chargés ne se lient pas au flagelle. Cette thèse s'inscrit donc dans la continuité de ces travaux en apportant une approche complémentaire, qui utilise les modèles membranaires biomimétiques. Ces derniers ont pu être couplés à des techniques de caractérisation et de visualisation utilisant la fluorescence. De plus, un test d'adhésion spécifique intégrant ces modèles membranaires a été développé dans le cadre de cette thèse, afin de quantifier l'adhésion bactérienne sur les bicouches lipidiques dans des conditions contrôlées. Des informations apportées par des simulations bio-informatiques, ainsi que des tests d'adhésion bactérienne sur cellules *in vitro* viennent compléter les outils utilisés durant ces travaux. En plus d'EHEC O157:H7, *Salmonella enterica* Typhimurium (ST), une autre entérobactérie également à l'origine d'intoxications alimentaires, a été étudiée.

Cette section *Résultats et Discussion* est divisée en quatre chapitres. Le premier abordera le choix du modèle biomimétique, ainsi que des preuves supplémentaires d'une interaction entre le flagelle bactérien et les phospholipides, par microscopie à épifluorescence et grâce au test d'adhésion développé. Le deuxième chapitre se focalisera sur le rôle des têtes polaires, notamment dans le contexte d'une potentielle interaction électrostatique. Les adhésions sur des lipides présentant des têtes variables, puis de leurs chaînes carbonées seront comparées. Puis l'hypothèse émise à la suite de ces résultats sera confirmée sur cellules *in vitro*. Le troisième chapitre s'intéressera de manière plus fine à l'interaction avec la membrane, en étudiant l'impact de l'adhésion sur l'ordre des lipides *via* la mesure de la polarisation généralisée de la sonde fluorescente Laurdan et, *a contrario*, l'impact de la méthylation du flagelle sur l'adhésion. De nouveaux paramètres seront alors identifiés et les niveaux d'adhésion variables sur des modèles biomimétiques, simulant des ségrégations lipidiques, montreront que le flagelle confèrerait à la

bactérie un atout dans l'adhésion sur les radeaux lipidiques, si leur présence sur la membrane est dans le future avérée. Pour finir, le quatrième chapitre récapitulera tous les paramètres clés des membranes de lipides étudiées tout au long du manuscrit, ainsi que des caractéristiques physiques apportées par des simulations par dynamique moléculaire. Toutes ces informations seront traitées par une recherche de corrélation, pour dégager les contributions respectives de chaque variable, ainsi que leur relation entre elles. Ce dernier chapitre se terminera par la présentation de résultats préliminaires portant sur une éventuelle interaction entre le flagelle et l'actine corticale. Chaque chapitre se terminera par une conclusion et une sous-discussion revenant sur les faits marquants de chaque chapitre avec un regard critique.

II. Adhésion du flagelle bactérien sur les phospholipides de la membrane

Ce premier chapitre est le point de départ de ma thèse, puisqu'il présentera brièvement le modèle biomimétique qui sera utilisé tout au long de mes travaux, puis des preuves supplémentaires de l'interaction entre le flagelle bactérien et les phospholipides de la membrane. Cette interaction sera observée dans un premier temps par microscopie, puis quantifiée grâce à la mise au point d'un test d'adhésion, spécialement créé pour utiliser ce modèle biomimétique en tant que support d'adhésion.

1. Choix du modèle biomimétique et de son moyen d'obtention

Le flagelle bactérien possède un diamètre de 20 nm et peut mesurer jusqu'à 20 µm de long (Macnab 2003), le choix du modèle biomimétique doit être adapté à ces dimensions. Les vésicules géantes unilamellaires (GUVs pour *Giant Unilamellar Vesicles*) sont des sphères lipidiques creuses mesurant des tailles supérieures au micromètre pour atteindre des tailles équivalentes aux cellules eucaryotiques, soit quelques dizaines de micromètres. En plus d'être formées par une bicouche lipidique qui est l'élément structural de la membrane plasmique, elles présentent une courbure similaire à celle de la membrane cellulaire eucaryote. La courbure membranaire est une caractéristique déterminante pour certaines interactions, par exemple elle peut être un facteur de ségrégation protéique (McMahon et Boucrot 2015). Plus précisément, certaines protéines transmembranaires, notamment le complexe formé par le chimiorécepteur TlpA chez *Bacillus subtilis*, possèdent une forme intrinsèque courbée expliquant leur préférence

pour la courbure, de la même manière que les protéines périphériques avec des domaines BAR, ayant une forme de croissant (Strahl *et al.* 2015). Par ailleurs, ces grandeurs communes avec la membrane font des GUVs un support adéquat pour étudier l'interaction de lipides directement avec des micro-organismes, en particulier l'invasion de *Pseudomonas aeruginosa* (Eierhoff *et al.* 2014).

Plusieurs méthodes existent pour former les GUVs (cf. *Synthèse Bibliographie*). Nous avons choisi la méthode d'hydratation assistée par gel. Celle-ci a l'avantage d'être facile et rapide à mettre en œuvre et de permettre l'utilisation de n'importe quelle composition lipidique, même en conditions physiologiques. Au cours des premières expériences, un mélange de phosphatidylcholines extrait d'œuf, nommé egg-PC d'après son nom commercial, a été utilisé. La sélection de ce mélange repose sur l'abondance première des phosphatidylcholines dans la membrane des cellules eucaryotes. Ce mélange a été caractérisé par LC-MS (Figure 55), afin de connaître précisément le profil et la proportion de l'ensemble des phospholipides contenus dans celui-ci.

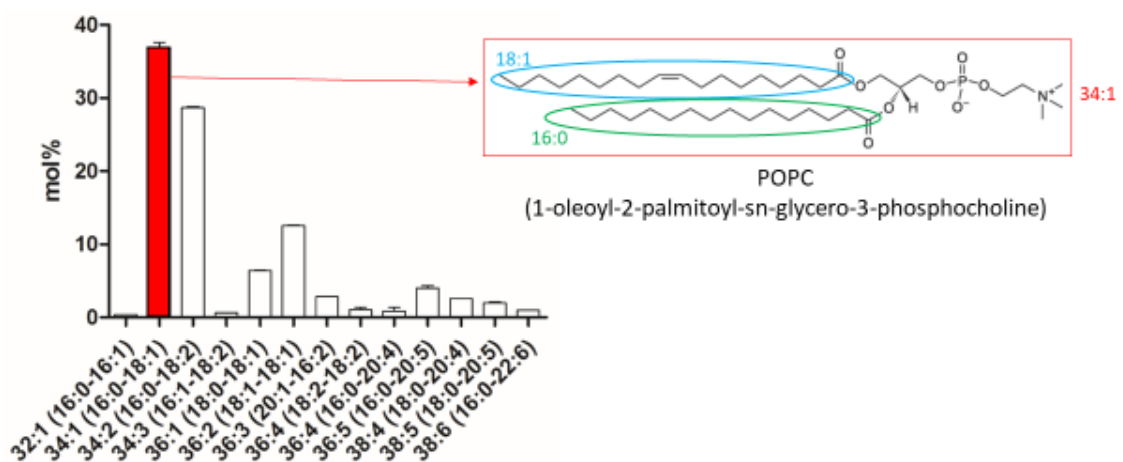


Figure 55: Composition lipidique des phosphatidylcholines présentes dans egg-PC, résolue par LC-MS. POPC, en rouge, possède une chaîne carbonée de 16 carbones sans insaturation et une chaîne carbonée de 18 carbones avec 1 insaturation, celles-ci sont respectivement désignées entre parenthèse par 16:0 et 18:1. Leur combinaison donne ainsi le PC 34:1, le composé majoritaire de ce mélange.

Dans la technique d'hydratation assistée par gel, plusieurs gels ont démontré leur capacité à former des GUVs, comme l'ultra-low melting agarose qui possède une température de gel inférieure à l'agarose standard (Horger *et al.* 2009). Un autre gel largement répandu est l'alcool polyvinylique (PVA, pour *Polyvinyl Alcohol*), qui peut être utilisé en présence ou non de sucre pour faciliter le détachement des lamelles lipidiques entre elles, en particulier avec certains mélanges de lipides (Weinberger *et al.* 2013). Ces gels ont été testés dans nos configurations et conditions expérimentales dans du tampon salin HEPES (20 mM HEPES pH 7,4 ; 150 mM NaCl).

La bonne formation des GUVs et la distribution des tailles sont observées au microscope à épifluorescence (Figure 56). Au préalable, un lipide fluorescent composé de DPPE (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) conjugué à un fluorochrome NBD, le NBD-PE, est ajouté à la solution chloroformique d'egg-PC avant la formation du film lipidique. L'ajout de ce lipide, en proportion molaire de 2%, sera effectué tout au long de ces travaux à chaque fois qu'il sera nécessaire de visualiser des liposomes. L'observation des GUVs, directement dans les puits de formation, permet de voir le détachement des vésicules du fond de la lame, puis les liposomes détachés en suspension (Figure 56A). Comme décrit dans la littérature, l'agarose standard ne nous permet pas d'obtenir de GUVs, contrairement à l'ultra-low melting agarose et le PVA (Figure 56B-C) (Horger *et al.* 2009; Weinberger *et al.* 2013). De même, l'ajout de sucrose permet d'obtenir une concentration plus importante de liposomes en suspension, donc détachés. En effet, la pression osmotique induite par l'ajout de sucre améliore la répulsion entre les lamelles lipidiques, qui est d'autant plus difficile à obtenir lorsque le lipide n'est pas chargé (Tsumoto *et al.* 2009). Toutefois, l'utilisation de l'ultra-low melting agarose présente un inconvénient par rapport au PVA, puisqu'une partie de celui-ci est encapsulée dans les liposomes formés (Lira *et al.* 2014). Notre choix de méthode de formation des GUVs s'est, par conséquent, porté sur le PVA en présence de sucrose.

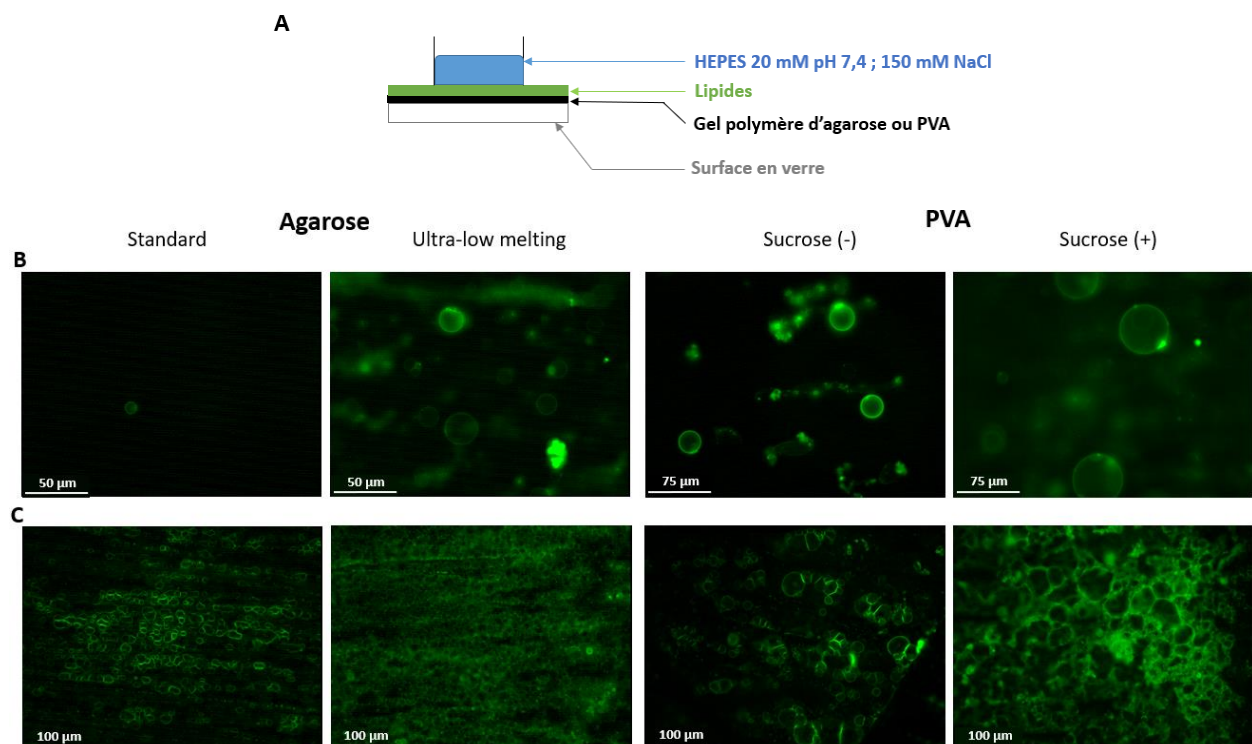


Figure 56 : Formation de GUVs egg-PC par hydratation assistée par gel. Les images sont prises dans les puits de formation schématisés en (A), (B) au centre du volume de tampon et (C) au fond du puits. Les GUVs contiennent 2% molaire de NBD-PE et sont ainsi visibles en vert.

2. Visualisation de l'interaction entre bactéries et GUVs

Etant donné que les tailles des GUVs et des bactéries sont de l'ordre du μm , ces objets peuvent être visualisés par microscopie sans difficulté. Contrairement aux GUVs, les bactéries ne sont pas marquées et sont seulement observables en microscopie de contraste de phase. Les GUVs ayant tendance à sédimenter, ne peuvent pas être visualisées classiquement entre une lame et une lamelle en verre, car elles risquent de fusionner en bicouches supportées au contact du verre (Figure 57A) (Brian et McConnell 1984). Plusieurs revêtements ont donc été testés, d'une part pour garder les liposomes intacts, et d'autre part pour définir les conditions optimales pour l'observation de l'interaction bactéries/vésicules.

Un premier essai a été réalisé directement dans le puits de formation des GUVs, qui est revêtu de PVA. Malheureusement, les lipides déposés au préalable sur la couche de polymère entraînent une forte fluorescence en arrière-plan (Figure 57B). De plus, la configuration en puits provoque au fur et à mesure la dérive des liposomes vers les extrémités. Cette mobilité impacte énormément la qualité d'observation, qui de plus, n'est pas facilitée par la motilité des bactéries.

Un substrat d'or a été ensuite utilisé, car il offre la possibilité d'ancrer les liposomes à sa surface. Nous avons donc effectué un couplage des GUVs sur une surface d'or fonctionnalisée avec des fonctions amines (cf. *Matériels et Méthodes*) via une liaison amide covalente. Pour ce faire, les liposomes ont été formés à partir d'un mélange de lipides contenant du DPPE présentant un groupement dodécanoyl avec une fonction acide carboxylique. Une fois l'immobilisation accomplie, très peu de liposomes ont pu être observés sur la surface, car la plupart d'entre eux ont été détériorés (Figure 57C). En effet les nombreux passages de solution, indispensables pour les différentes étapes du couplage amide, ont pu entraîner un flux trop fort dû à l'étroitesse du montage nécessaire à l'observation par microscope.

Par la suite, une immobilisation par physisorption, ne nécessitant aucune manipulation supplémentaire, avec la caséine et l'or oxydé a été testée. Ces deux supports offrent une immobilisation suffisante des liposomes, par contre la caséine entraîne une adhésion non spécifique importante des bactéries sur le support, contrairement à l'or oxydé (Figure 57D-E).

Finalement parmi toutes les surfaces de travail expérimentées, l'or oxydé regroupe nos critères pour une observation optimale à savoir, une immobilisation des liposomes, l'absence visible d'une interaction non spécifique avec le support et une intégrité des vésicules. Le couplage des GUVs à la surface d'or sera amélioré et expliqué ci-après (Figure 61) avec l'emploi d'un autre lipide d'ancrage.

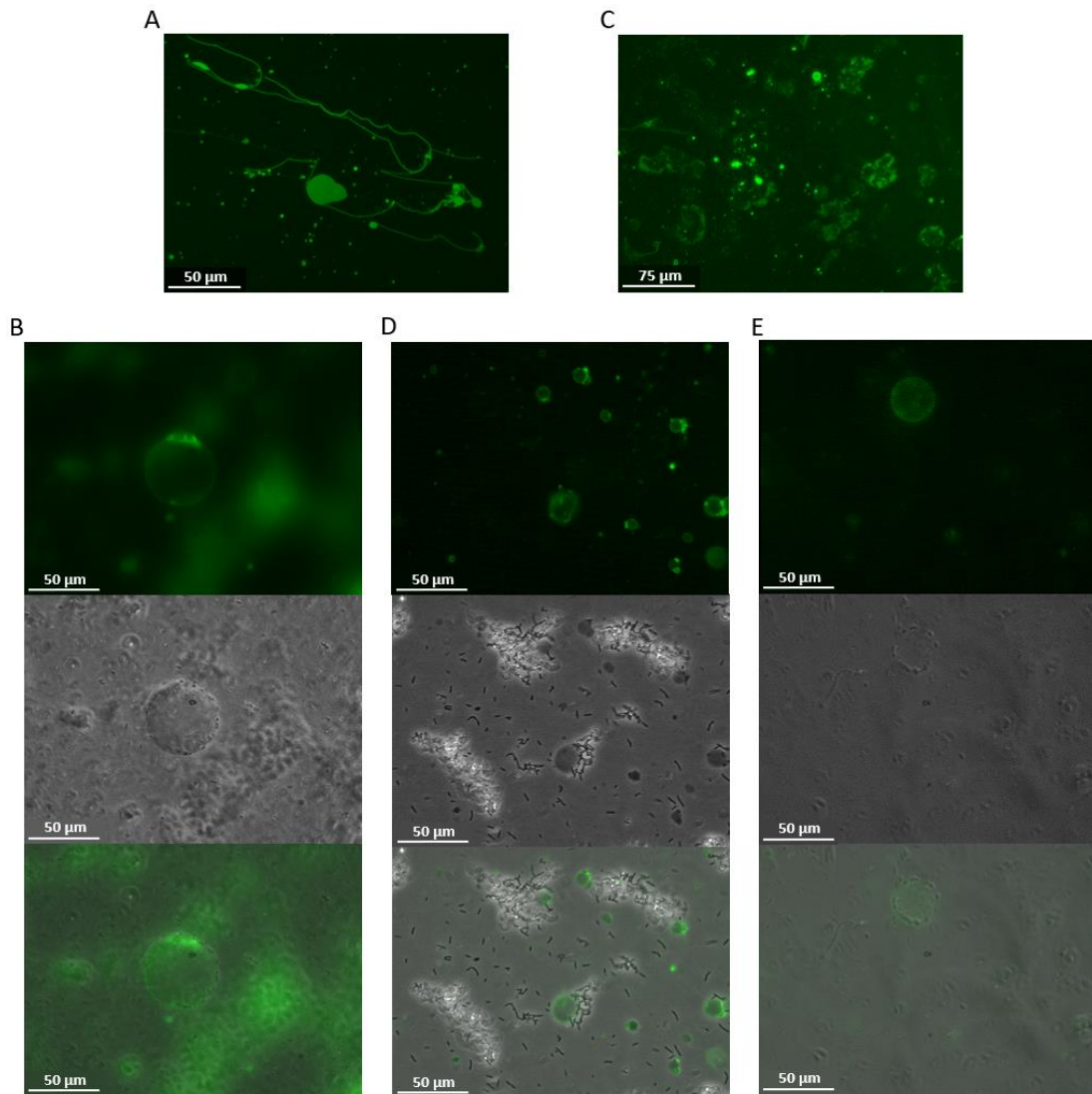


Figure 57 : Visualisation de l'interaction entre bactéries et GUVs egg-PC sur différents supports : (A) verre, (B) PVA, (C) or-couplage amide, (D) caséine et (E) or-oxydé. Les bactéries sont visibles en contraste de phase.

Pour observer l'interaction entre la bicouche lipidique et le flagelle bactérien, les GUVs sont incubées en présence d'une souche d'EHEC O157:H7 WT ou une souche mutante incapable de produire la flagelline, O157:H7 $\Delta fliC$, comme contrôle négatif. La flagelline (FliC) est la protéine du filament qui constitue la majeure partie du flagelle (cf. *Synthèse Bibliographique*), par conséquent la délétion de ce gène entraîne l'absence de flagelles chez la bactérie. Ces phénotypes sont confirmés par un test de motilité, sur lequel seul O157:H7 WT produit un halo qui correspond au déplacement des bactéries (Figure 58).

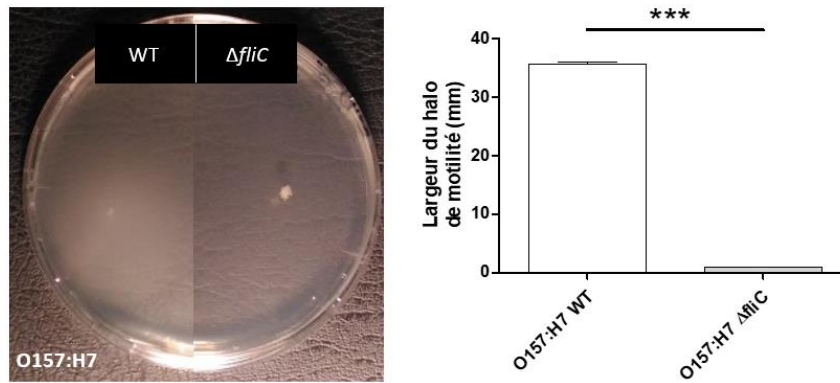


Figure 58 : Comparaison de la motilité entre O157:H7 WT et O157:H7 Δ fliC à 37°C pendant 10 h. La motilité d'une bactérie est évaluée sur un milieu dit « de motilité », qui possède une teneur en agarose adéquate pour permettre le cas échéant à la bactérie d'évoluer dans ce milieu. L'avancée des bactéries motiles se traduit par un halo sphérique plus ou moins large, alors que celles non-motiles présentent une colonie en surface. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$.

Après une heure d'incubation des bactéries avec les GUVs, les échantillons sont déposés sur une surface d'or oxydé et visualisés au microscope à épifluorescence. Très peu de bactéries O157:H7 Δ fliC sont visibles autour des GUVs (Figure 59A), contrairement aux bactéries O157:H7 WT, dont plusieurs d'entre elles peuvent être visualisées sur les GUVs (Figure 59B). Le flagelle semble donc être à l'origine de cette adhésion.

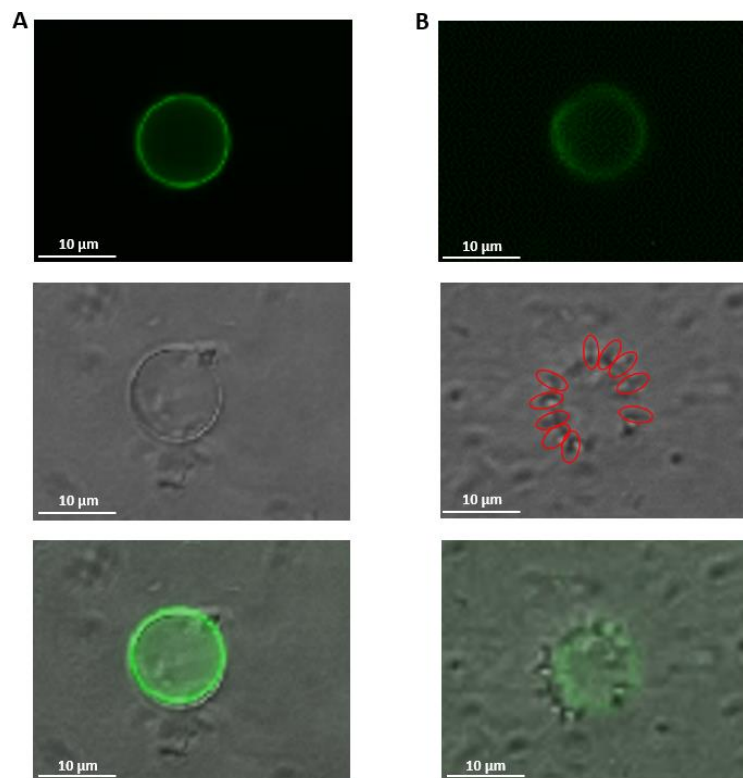


Figure 59 : Interaction entre un GUV egg-PC avec EHEC O157:H7 (A) Δ fliC et (B) WT. Les cercles rouges montrent les bactéries autour du GUV.

Cependant, sur ces images, seul le corps de la bactérie est visible car le flagelle est trop fin pour être distingué. Pour visualiser le flagelle, une souche de *Salmonella enterica* Typhimurium (ST) possédant une substitution de thréonine en cystéine au niveau des domaines variables de la flagelline, a été utilisée. En effet, cette substitution permet d'augmenter le marquage spécifiquement sur le flagelle par réaction des thiols, en particulier les cystéines, avec le maléimide couplé à un fluorochrome Alexa Fluor® 594 (Figure 60A). Grâce à ce marquage, la liaison entre le flagelle et la bicouche lipidique est distinctement visible (Figure 60B). Le suivi, pendant plusieurs secondes, de cette interaction, permet de constater que le flagelle reste en contact avec la bicouche et continue d'évoluer autour du GUV (Figure 60C). Ainsi, l'interaction ne bloque pas la motilité de la bactérie, de même que la motilité n'empêche pas le contact constant avec la bicouche.

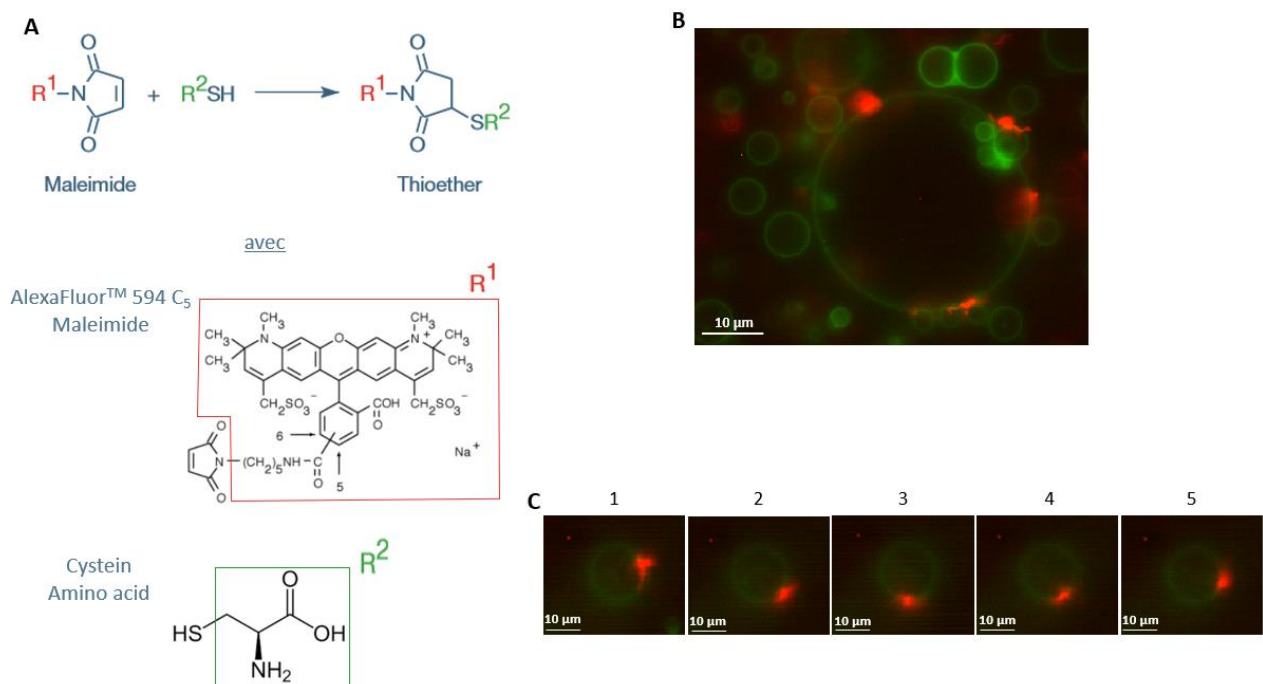


Figure 60 : **Interaction entre le flagelle de ST et les GUVs egg-PC.** (A) Principe du marquage du flagelle. (B) Liaison de plusieurs flagelles sur une GUV. (C) Mouvement d'un flagelle sur une GUV, les images ont été prises à un intervalle de 3 secondes.

3. Quantification de l'adhésion bactérienne sur liposomes

L'interaction étant dynamique et les GUVs des objets tridimensionnels, l'utilisation de la microscopie ne permet pas de quantifier l'adhésion bactérienne précisément. Par conséquent, nous avons développé notre propre outil pour quantifier cette adhésion. Cette technique consiste en plusieurs grandes étapes récapitulées en Figure 61. Les liposomes sont tout d'abord

préparés en mélangeant les lipides avec un lipide d'ancrage, le DSPE-PEG-PDP qui comporte le lipide 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) couplé sur sa tête polaire à un PEG d'une masse molaire de 20 000 g/mol, soit 45 unités d'éthylène glycol, qui joue le rôle d'espaceur entre le support et la bicouche lipidique. Ce PEG est lui-même couplé à un groupement PDP contenant une fonction disulfure. L'atome de soufre formant avec l'or une liaison covalente, les liposomes sont ainsi directement immobilisés sans nécessité de fonctionnalisation l'or (Häkkinen 2012). Un rinçage avec du tampon est néanmoins nécessaire pour éliminer les liposomes non fixés. La surface occupée par les vésicules est ensuite mise en contact avec une suspension bactérienne durant une heure, puis rincée avec du tampon pour ne garder que les bactéries adhérentes sur les liposomes. Leur nombre est finalement déterminé par dénombrement sur milieu de culture, suite à une succession de dilutions. La méthode que nous avons développée est très flexible, car elle possède l'avantage de permettre l'utilisation de différents phénotypes bactériens, tailles de liposome, compositions lipidiques ainsi que d'autres conditions expérimentales.

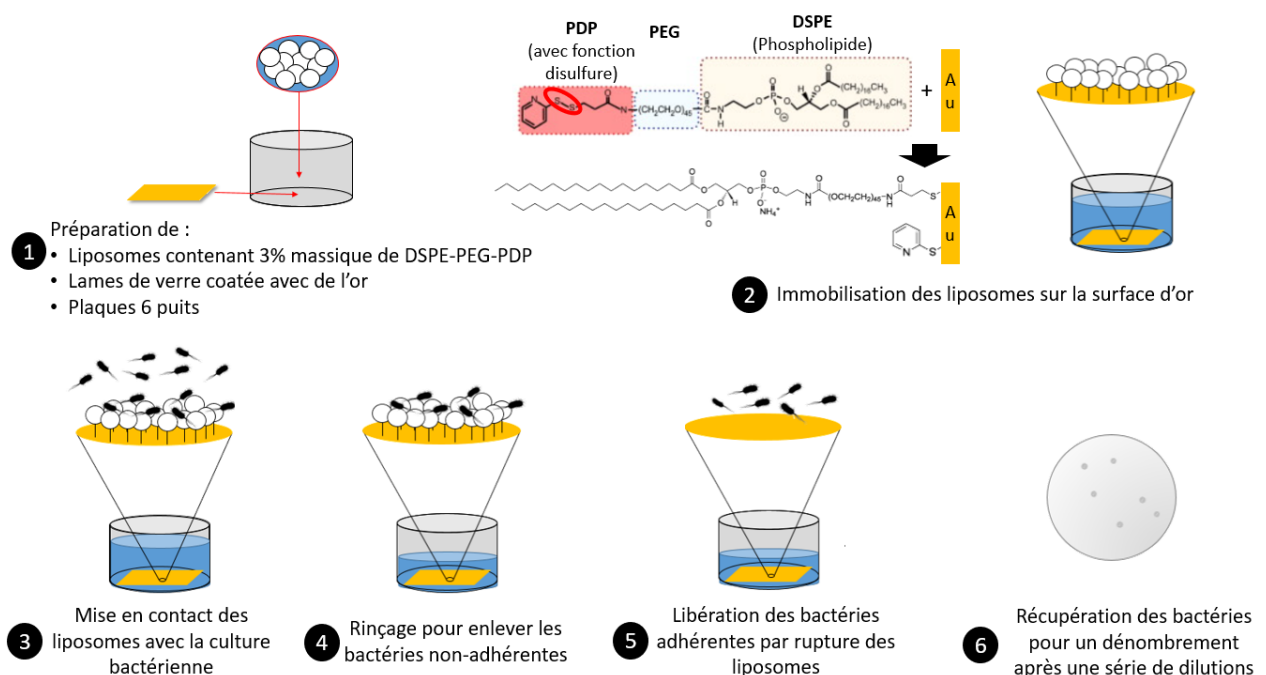


Figure 61 : Les étapes de la quantification de l'adhésion bactérienne sur liposomes.

A l'issue de chaque test d'adhésion, une concentration de bactéries exprimée en CFU/ml est obtenue en fonction de la quantité de GUVs déposée à l'étape 1 (Figure 61). Plus précisément les GUVs, lors de leur dépôt sur l'or, sont réparties sur une surface égale à 4,75 cm² (Figure 62). L'adhésion non spécifique sur le plastique du puits, dans lequel est placée la surface de liposomes, est toujours déduite des niveaux d'adhésion présentés. Cette valeur est tout

simplement mesurée dans des puits vides, en suivant les mêmes étapes que dans le cas d'une mesure d'adhésion sur liposomes (Figure 61). D'autre part, les bactéries sont prélevées au préalable sur un milieu de motilité, afin de s'assurer d'avoir les individus les plus motiles pour les expériences.

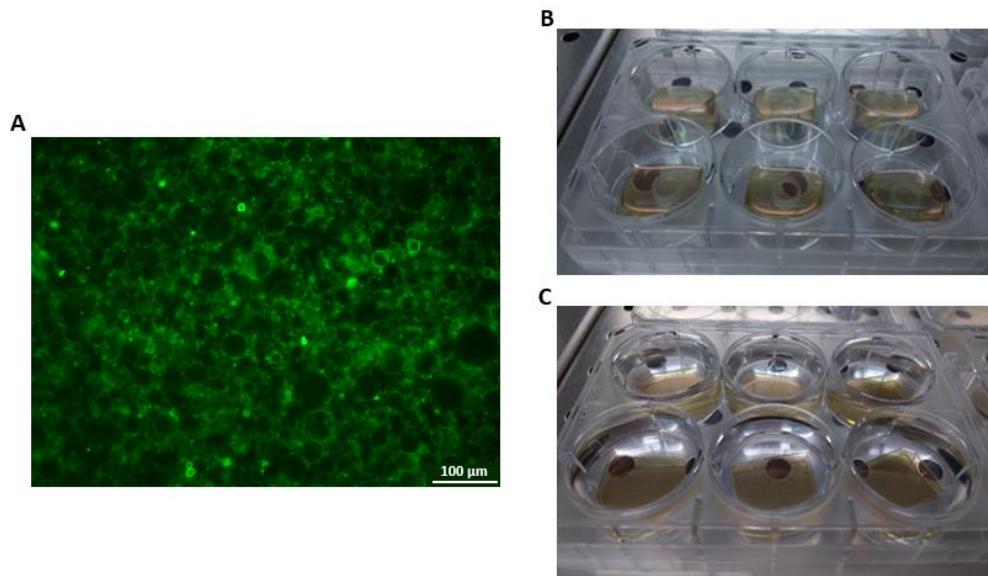


Figure 62 : Immobilisation des liposomes sur lame d'or durant le test d'adhésion. (A) Vue d'une partie de la lame d'or recouverte de GUVs après (B) immobilisation et (C) rinçage. Le test d'adhésion se déroule dans des plaques 6 puits classiquement utilisées en culture cellulaire en plastique, traité aux rayons gamma.

3.1. Corrélation entre lipide et adhésion bactérienne

Grâce à la méthode décrite ci-dessus, l'adhésion bactérienne sur des concentrations croissantes en vésicules géantes, toujours composées d'egg-PC et de DSPE-PEG-PDP à un ratio de 3% massique, a été établie. Cette gamme de concentrations est obtenue par dilutions successives d'une solution mère de GUVs, dont la concentration a été déterminée par dosage colorimétrique de Stewart (Stewart 1980). Après le dénombrement d'O157:H7 WT pour cette série de concentrations, une relation quasi-linéaire avec la quantité déposée de GUVs est révélée jusqu'à 5 μg (Figure 63A). Au-delà de cette quantité, une saturation apparaît. Celle-ci peut potentiellement provenir d'une occupation totale de la surface en vésicules déjà atteinte, ou d'un encombrement stérique des bactéries adhérentes sur les liposomes empêchant l'adhésion de plus de bactéries. Pour étudier ces hypothèses, la quantité de GUVs immobilisées a été déterminée pour 5 μg et 10 μg de liposomes déposés. Au final, la quantité immobilisée est doublée entre 5 μg et 10 μg déposés (Figure 63B). De ce fait, la saturation semble provenir plutôt d'un encombrement des bactéries à la surface des GUVs. Ce résultat montre aussi que l'interaction non spécifique sur l'or n'a pas une forte influence, puisque lorsque le nombre de

liposomes augmente, l'accès à la surface d'or diminue ce qui n'entraîne pas pour autant une diminution de l'interaction.

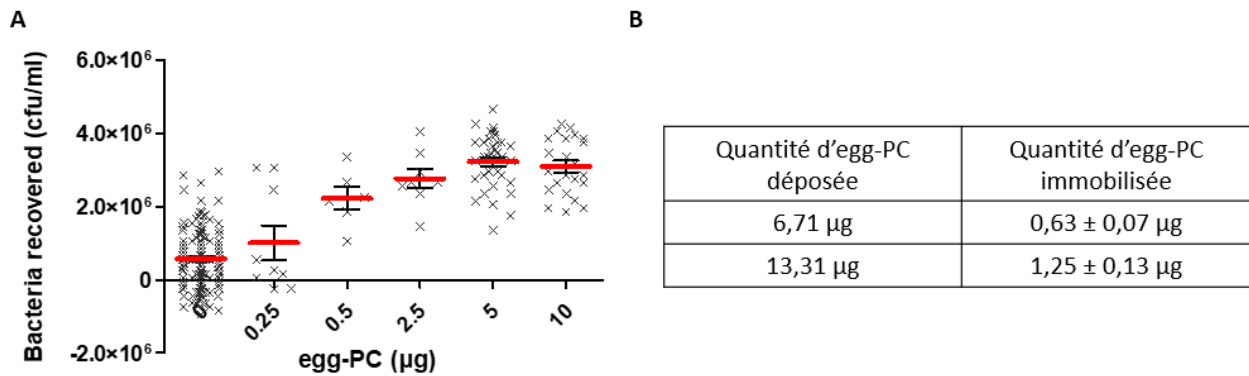


Figure 63 : Relation entre la quantité de GUVs déposées et l'adhésion bactérienne. (A) Corrélation de la masse de lipides déposés avec la quantité de bactéries adhérentes. (B) Relation entre la quantité de GUVs egg-PC déposée et immobilisée. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes.

En plus d'avoir démontré une corrélation entre la quantité de liposomes déposés et l'adhésion bactérienne, cette expérience nous a permis d'établir la quantité optimale de vésicules à déposer. Travailler à 5 µg permet d'obtenir la réponse la plus élevée, tout en évitant de rajouter une quantité supplémentaire superflue de liposomes.

3.2. Les bactéries flagellées adhèrent davantage que les non-flagellées

Pour appréhender le rôle du flagelle dans l'adhésion bactérienne sur la bicouche lipidique, des tests d'adhésion sur GUVs ont été effectués avec des bactéries flagellées, flagellées non motiles et non flagellées chez O157:H7 et ST. Les mutants $\Delta motA$ et $\Delta motAB$ respectivement chez O157:H7 et ST sont tous deux non-motiles, puisque ces deux protéines composent les conduits à protons qui génèrent l'énergie servant à la rotation du flagelle (Figure 64). Quant au mutant $\Delta flgKL$ chez ST, FlgK et FlgL sont les protéines jonction entre le coude et le filament et sont indispensables à l'assemblage du filament sur le coude, leur absence entraînant un défaut de flagelle (Figure 64).

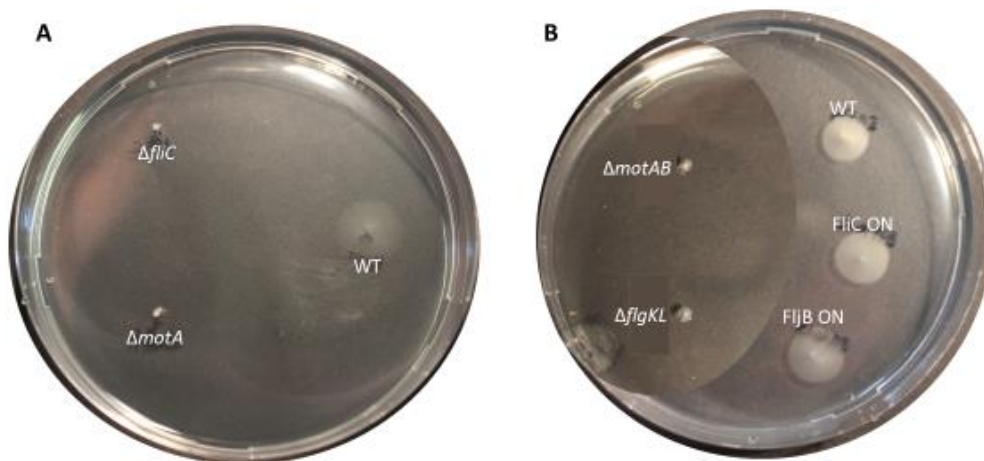


Figure 64 : Tests de motilité pour (A) O157:H7 et (B) ST à 37°C pendant 7 h

Que ce soit chez O157:H7 ou chez ST, l'absence de flagelles ou leur immobilité induisent une diminution significative de l'adhésion bactérienne (Figure 65A-B). Le manque de motilité affecte davantage l'adhésion de ST que d'O157:H7 (Figure 65A-B). Chez *Salmonella*, il existe une variation de phase, c'est-à-dire que le filament peut être constitué soit de la flagelline FliC, soit de la flagelline FljB (cf. *Synthèse Bibliographie*). WT correspond à un mélange de ces deux populations. Les individus, nommés FljB ON, n'exprimant que FljB adhèrent moins que les individus FliC ON n'exprimant que FliC. Etant donné que WT présente un niveau d'adhésion intermédiaire, la présence de FliC semblerait donner un avantage à la bactérie pour adhérer à la bicouche lipidique (Figure 65C). Plus généralement en comparant l'adhésion entre ces deux espèces bactériennes au niveau de la flagelline FliC, l'adhésion de FliC ON chez ST est au moins 10 fois plus importante que celle de WT chez O157:H7. Cette différence est sensiblement moins élevée entre les deux souches non-flagellées. Par conséquent, le flagelle de ST posséderait donc un léger avantage par rapport à O157:H7 pour adhérer sur la bicouche lipidique.

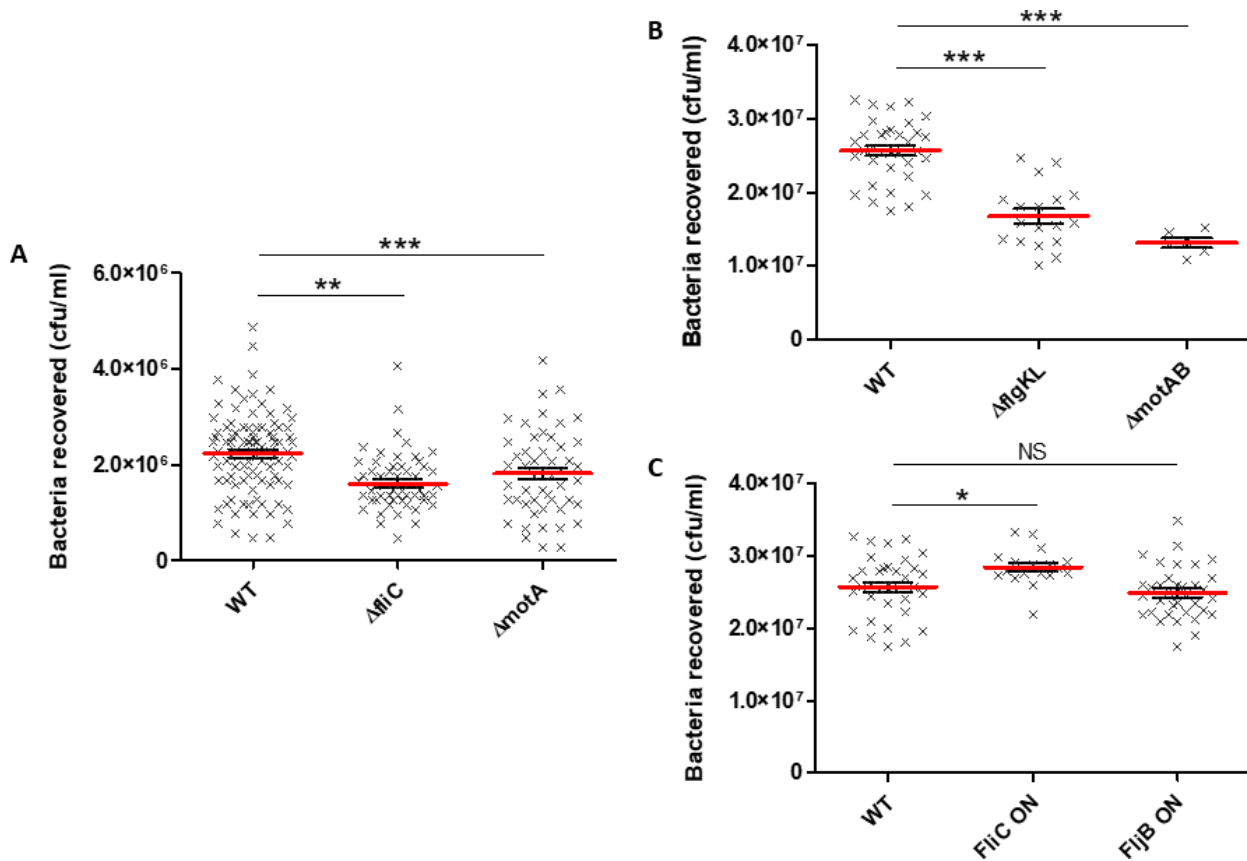


Figure 65 : Adhension de (A) EHEC O157:H7 et (B) (C) ST sur GUVs egg-PC. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,005$; *: $P \leq 0,05$; NS : non significatif.

4. Conclusion et sous-discussion

Le bénéfice du flagelle dans l'adhésion sur des modèles biomimétiques composés de phospholipides a été aussi bien observé par microscopie, que mesuré par comparaison des niveaux d'adhésion avec un mutant dépourvu de flagelles, chez EHEC que ST (Figure 66). En outre, son implication dans l'adhésion sur une variété d'hôtes, que ce soit chez les mammifères ou chez les plantes, est très largement documentée (Rossez *et al.* 2015). Pourtant, l'interaction du flagelle avec des lipides a été rarement décrite (Rossi *et al.* 2019). Au niveau des phospholipides, plusieurs sérotypes d'*E. coli* incluant O157:H7 ont montré leur capacité à adhérer sur des lipides chargés négativement *in planta* (Rossez *et al.* 2014). La motilité du flagelle permet à la bactérie de se déplacer vers des endroits favorables, notamment en direction de composition lipidique de la membrane plasmique adéquate pour envahir l'hôte (Tawk *et al.* 2018). D'après nos résultats, la motilité est aussi un facteur pour adhérer sur la bicouche lipidique. Cependant, le manque de motilité s'avère plus impactant pour ST que pour O157:H7. Pourtant leur flagelle a une structure et une vitesse similaire, maximale à 300 Hz (Minamino et Imada 2015).

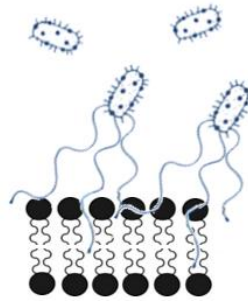


Figure 66 : Le flagelle et sa motilité augmentent l'adhésion bactérienne

ST possède une variation de phase, ce qui aide la bactérie à échapper au système immunitaire, en alternant entre les flagellines *FliC* et *FliB* (Bonifield et Hughes 2003; Akira *et al.* 2006). Toutefois, *FliC* démontre une légère meilleure adhésion sur les lipides et une habilité pour les bactéries à coloniser davantage les tissus intestinaux (Horstmann *et al.* 2017).

Ainsi d'après les résultats présentés, le flagelle confère une adhésion supplémentaire sur la bicouche lipidique, exacerbée par la motilité. Ces conclusions, issues aussi bien de l'adhésion de ST que d'EHEC sur la bicouche lipidique, pourraient également s'appliquer plus largement à d'autres bactéries.

III. L'agencement de la bicouche, paramètre clé de l'adhésion bactérienne *via* le flagelle

Dans ce deuxième chapitre, nous avons cherché à comprendre le mécanisme d'adhésion du flagelle en modulant la composition lipidique de la membrane. En particulier, nous avons étudié la possibilité d'une interaction électrostatique entre le flagelle et les têtes polaires des lipides de la bicouche. Puis, nos investigations ont porté sur l'impact de la nature des chaînes carbonées sur l'adhésion bactérienne dans des modèles GUVs, puis au sein des membranes de cellules.

1. Versatilité du test d'adhésion sur liposomes face à des compositions lipidiques diverses

Une bibliothèque d'une dizaine de compositions lipidiques, dont les lipides possèdent des têtes polaires variables, a été constituée dans le but d'étudier l'effet de la nature de la tête

polaire sur l'adhésion d'O157:H7 WT. POPC a été choisi comme base pour tous les mélanges, car il s'agit du composé majoritaire d'egg-PC (Figure 55). De plus, sa présence dans les mélanges de lipides permet d'assurer une bonne formation des GUVs, tout en comparant l'influence du lipide majoritaire. En effet, certains lipides, à cause de leur géométrie propre, ne forment pas spontanément des bicouches en milieu aqueux (Frolov *et al.* 2011). Par exemple, PE possède une petite tête polaire, qui lui vaut une géométrie dite de cône inversé, qui est favorable à son association en phase hexagonale. Pour pallier ces limitations, de manière générale, nous avons travaillé avec des mélanges composés de 40% molaire de POPC et 60% molaire d'un autre lipide. La formation des vésicules géantes, par hydratation comme décrite précédemment, a été vérifiée par microscopie à épifluorescence (Figure 90, cf. *Annexe des résultats*). Dans le cas de MGDG, un lipide possédant une tête polaire neutre, cette proportion a été adaptée à 50% molaire, car un nombre insuffisant de GUVs était obtenu pour 60% molaire de MGDG. Cette difficulté pourrait provenir de la géométrie de ce lipide en cône inversé (Jouhet 2013).

De plus, la composition lipidique des GUVs formées a été analysée par RMN ^1H et comparée à celle du mélange lipidique théorique utilisé pour leur formation. Pour tous les mélanges, les proportions lipidiques initiales restent identiques après formation des GUVs (Tableau 5, cf. *Annexe des résultats*).

De manière à pouvoir comparer l'adhésion entre GUVs de compositions différentes, celles-ci doivent être immobilisées de la même manière et au même niveau de recouvrement de la surface d'or, quelle que soit leur composition lipidique. Pour ce faire, le taux d'immobilisation sur la surface d'or a été déterminé par GC-FID (Tableau 6, cf. *Annexe des résultats*). Au final, ce taux d'immobilisation est indépendant de la composition lipidique, puisqu'il est similaire d'une composition à l'autre et se situe aux alentours de 9-10%. Cette valeur correspond au pourcentage de GUVs immobilisées par rapport à la quantité totale de GUVs déposées.

En s'intéressant aux caractéristiques des GUVs, nous nous sommes aperçus que la composition lipidique influe sur la taille moyenne des GUVs obtenues, variant pour nos mélanges de 6,5 μm à 10 μm (Figure 67A). La taille moyenne des GUVs est calculée à partir de la mesure de taille d'au moins 250 objets par microscopie, en prenant garde de réaliser plusieurs prises de vue dans la profondeur sur une même localisation, pour visualiser aussi bien les plus petits liposomes au fond de la lame que les plus gros, visibles moins profondément (Figure 67B). Cette variabilité pourrait *de facto* ajouter un facteur supplémentaire au niveau des résultats et complexifier leur analyse. De plus, nous avons observé qu'une même composition lipidique, à

savoir POPC seul, pouvait générer des GUVs de tailles moyennes variables. Cette variation de la taille viendrait donc des conditions expérimentales, en particulier du gel PVA qui est préparé extemporanément, car la présence de sucrose conduit au développement de micro-organismes. Pour évaluer si cette hétérogénéité de taille de quelques micromètres entre mélanges pouvait impacter significativement l'adhésion bactérienne, plusieurs préparations de GUVs constituées de POPC, de taille moyenne variable, ont été examinées. Finalement, pour une différence de taille moyenne proche de 2 μm , l'adhésion bactérienne sur ces deux populations de GUVs demeure similaire (Figure 67C).

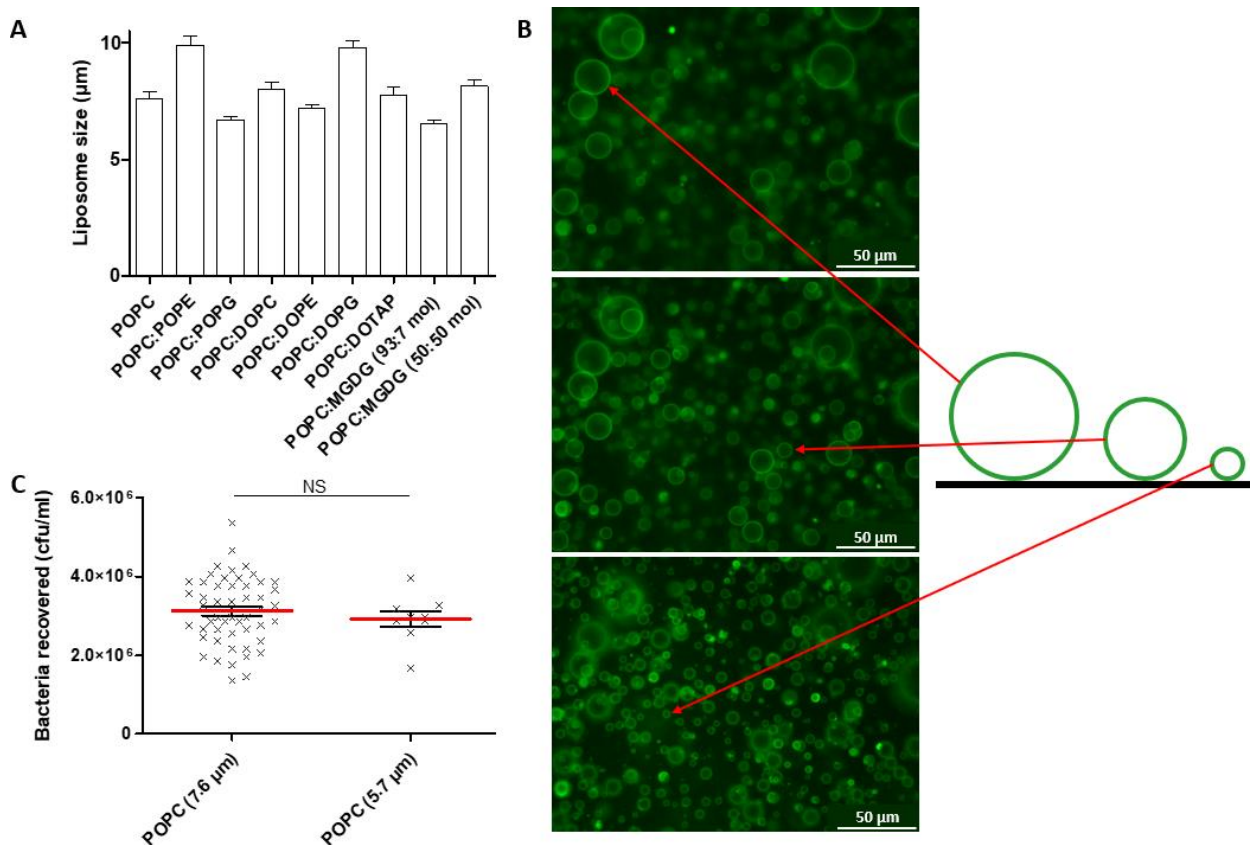


Figure 67 : Impact de la variabilité de taille des GUVs sur l'adhésion bactérienne. (A) Variation de la taille des GUVs en fonction de la composition lipidique. (B) Méthodologie pour déterminer la taille moyenne d'un échantillon de GUVs au microscope. (C) Adhésion d'O157:H7 WT sur deux préparations de POPC possédant des tailles bien distinctes, à savoir 7,6 μm et 5,7 μm . La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir d'au moins 250 mesures. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : NS : non significatif.

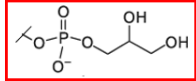
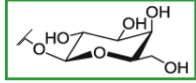
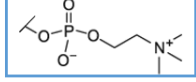
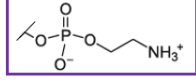

Tous ces contrôles, au niveau de l'obtention des GUVs, de leur composition lipidique, de leur taux de recouvrement sur l'or, ainsi que l'indépendance de la taille vis-à-vis de l'adhésion, assurent l'acquisition de résultats robustes et comparables. Tous les nouveaux mélanges, qui seront introduits dans la suite de ce manuscrit, auront été étudiés de la même manière et ces résultats sont disponibles en *Annexe des résultats*.

2. Les têtes polaires, premiers contacts du flagelle avec la bicouche lipidique

Les mélanges lipidiques, dont les caractéristiques ont été introduites précédemment, se distinguent par une tête polaire, qui leur confère leur charge (Tableau 4). Lorsqu'une structure colloïdale est en solution, comme un liposome, une double couche électrique formée par les ions du milieu l'entoure et confère un potentiel, appelé potentiel zêta. Ce dernier représente la charge réelle en solution de la particule, en l'occurrence la charge du liposome qui pourrait être à l'origine de l'interaction avec les bactéries. La détermination du potentiel zêta se réalise à salinité faible, car le champ électrique à appliquer pour dépasser l'écran de sels en milieu physiologique, ne serait pas supporté par les électrodes de mesure. De la même manière durant les tests d'adhésion, cet écran de sels forme une barrière contre les interactions électrostatiques le long des liposomes, qui gêne l'approche du flagelle. Cependant, le franchissement de cet obstacle peut être médié par la capacité du flagelle à tâtonner une surface (Friedlander *et al.* 2013). Cette proximité est favorable le cas échéant à une interaction électrostatique. La mesure du potentiel zêta à faible salinité permet de connaître la charge à la surface du liposome, lors de cet événement précis.

Le potentiel zêta a été déterminé pour tous les mélanges, dans un tampon de nature identique à celui utilisé lors des tests d'adhésion, mais avec une salinité 100 fois moins élevée (Tableau 4). Plus une valeur est négative, plus la charge en surface est négative et au contraire, plus une valeur est positive plus la surface est chargée positivement. Les valeurs de potentiel zêta déterminées ici sont fidèles à celles trouvées dans la littérature dans les mêmes conditions (Freire *et al.* 2011; Ribeiro *et al.* 2012).

Tableau 4 : Mélanges lipidiques pour l'étude de l'implication de la tête polaire dans l'interaction flagelle/phospholipides et de leur potentiel zêta. Le potentiel zêta a été déterminé dans un tampon HEPES salin (20 mM HEPES pH 7,4 ; 1,5 mM NaCl). Lorsqu'une composition n'est pas précisée, celle-ci est de 60% molaire pour le lipide indiqué et de 40% molaire POPC

PG		Lipide/ Mélange lipides	Potentiel zêta (mV)
MGDG		POPC	- 3,69 ± 3,65
PC		POPC:POPG	-39,40 ± 4,22
PE		POPC:POPE	-7,48 ± 3,50
TAP		POPC:DOPE	-8,12 ± 5,51
		POPC:DOPC	-4,37 ± 3,67
		POPC:DOPG	-56,50 ± 5,81
		POPC:MGDG (50:50 molaire)	-5,33 ± 3,93
		POPC:MGDG (93:7 molaire)	-3,79 ± 4,08
		POPC:DOTAP	53,00 ± 7,96

L'adhésion bactérienne d'O157:H7 WT a été comparée dans un premier temps entre POPC seul et en mélange avec POPE ou POPG, respectivement POPC:POPE et POPC:POPG. POPC et POPE sont des lipides zwitterioniques, contrairement à POPG qui possède une charge négative net. Lorsqu'une partie de POPC est remplacée par POPG, l'adhésion est significativement réduite (Figure 68A). Cette même diminution est observée également pour le mélange POPC:POPE, bien que POPE et POPG ont un potentiel zêta bien différent (Tableau 4). En revanche, la tête polaire PE possède la particularité d'être plus petite que PC et PG, ce qui entraîne davantage d'espace entre les lipides (Pécheur *et al.* 2002).

Ensuite, nous avons décidé de tester un lipide possédant une charge net positive, n'existant pas à l'état naturel, le lipide de synthèse DOTAP. Ce lipide possède deux acides oléiques, contrairement aux lipides précédemment utilisés qui sont constitués d'un acide palmitique et d'un acide oléique. Dans le cas de DOTAP, la présence d'une insaturation supplémentaire sur la seconde chaîne grasse induit un deuxième coude, qui gêne stériquement le rapprochement des lipides dans la bicouche et provoque donc un écartement plus important au niveau des têtes polaires. L'écartement des têtes polaires pouvant être un potentiel facteur de l'interaction entre le flagelle et la bicouche lipidique, l'adhésion bactérienne sur DOTAP a donc été comparée avec celles sur des lipides qui possèdent les mêmes acides gras que DOTAP. Finalement, aucune différence d'adhésion entre POPC:DOPC, POPC:DOPE et POPC:DOPG, de même qu'avec POPC:DOTAP n'est visible (Figure 68B). A noter, ces niveaux d'adhésion sont tous néanmoins moins élevés que celui observé précédemment sur POPC seul. Ainsi, ces résultats montrent qu'en fonction de la nature des chaînes carbonées, l'adhésion sur une même tête polaire diffère.

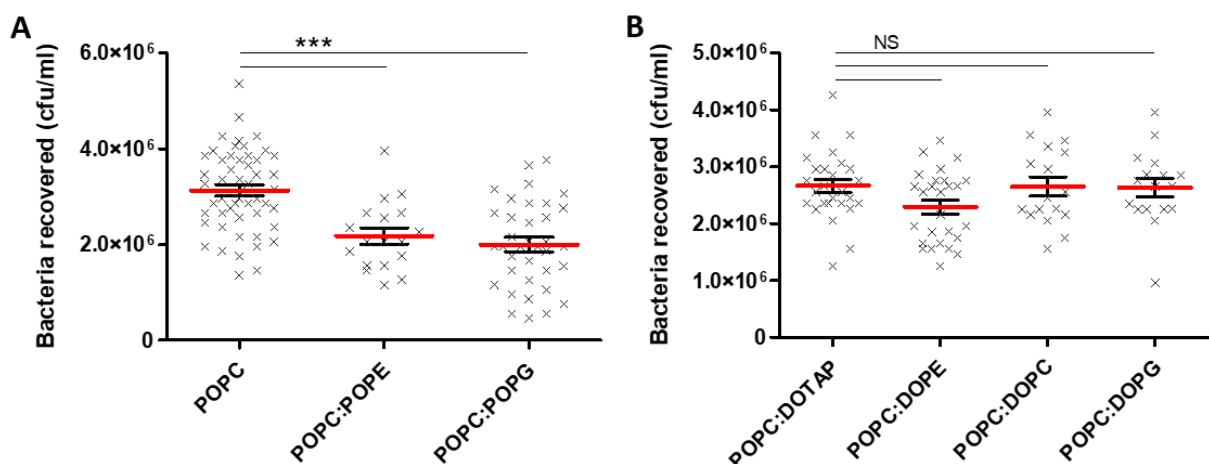


Figure 68 : Adhésion d'O157:H7 WT sur GUVs avec des compositions lipidiques variant au niveau des têtes polaires. La composition molaire de chaque mélange est de 60% pour le lipide indiqué et de 40% pour POPC. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,005$; *: $P \leq 0,05$; NS : non significatif.

Enfin, nous avons voulu tester un lipide pour lequel aucune interaction avec le flagelle n'a été décrite, le MGDG. Ce lipide neutre provient de la membrane du thylakoïde des chloroplastes chez les plantes. Une précédente étude n'a observé aucune liaison de flagelles purifiés d'O157:H7 avec des lipides non chargés, tels que MGDG (Rossez *et al.* 2014). Ici, une quantité molaire croissante de MGDG a été introduite, en mélange avec POPC, entraînant une diminution de l'adhésion d'O157:H7 WT (Figure 69A). L'adhésion est deux fois moins élevée lorsque, en proportion molaire, la moitié du POPC est remplacée par MGDG. Néanmoins ce lipide, tout comme PE, possède une plus petite tête donnant lieu à un espacement plus grand qu'avec POPC. De plus, cet écartement est d'autant plus exacerbé par la présence de chaînes carbonées polyinsaturées, majoritairement d'acides linoléiques (Figure 69B).

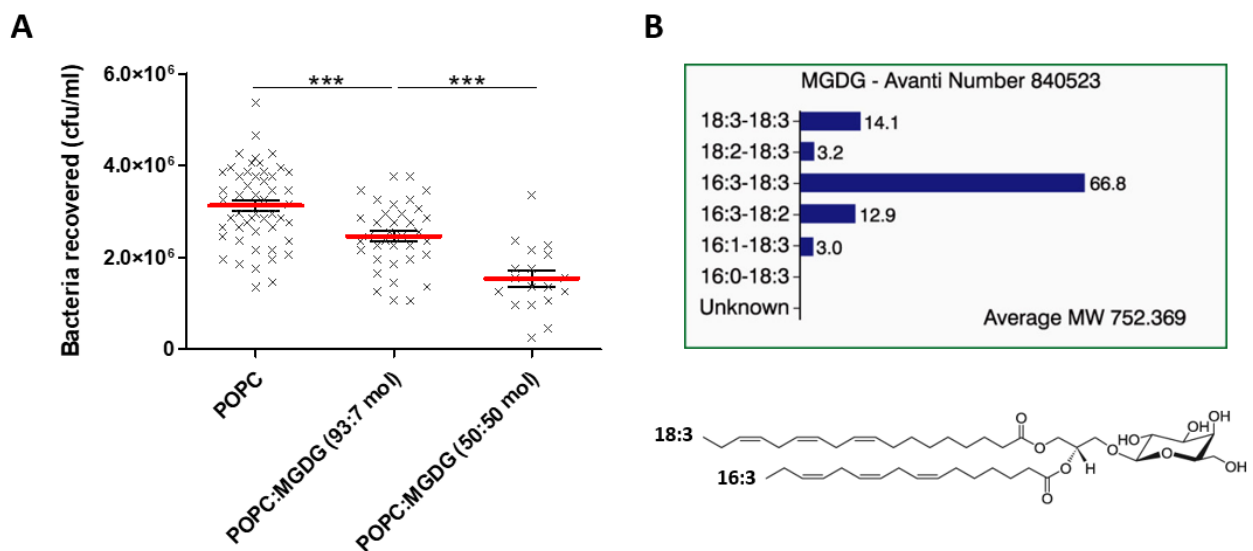


Figure 69 : Adhésion d'O157:H7 WT sur des GUVs possédant des compositions lipidiques avec une quantité molaire croissante de MGDG. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$. (B) Distribution en acides gras fournie par le fabricant, l'acide linoléique 18:3 est très bien représenté.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le lien entre l'adhésion d'O157:H7 WT et l'espacement des têtes polaires. Cet écart est contrôlé soit par une tête polaire naturellement petite comme PE ou MGDG, soit par rapport à la nature des chaînes carbonées, qui entraîne une agrégation plus ou moins forte des lipides. Toutefois, à un niveau d'incorporation inférieur par rapport au PE, de 50% molaire contre 60% molaire, MGDG conduit de manière significative à une diminution plus importante de l'adhésion. Par conséquent, la composition en acide gras des phospholipides semble avoir un rôle plus prépondérant sur l'adhésion bactérienne *via* le flagelle.

3. Les chaînes carbonées, un rôle sous-jacent dans l'interaction

Pour étudier la contribution des chaînes carbonées des lipides dans l'adhésion du flagelle, plusieurs lipides ayant une même tête polaire commune, PC, ont été sélectionnés. Ces différentes PC, pures ou en mélange, ont des niveaux d'insaturation variables, permettant de jouer sur l'écartement des têtes polaires (Figure 70). L'impact de la conformation d'insaturation a également été évalué au travers des isoméries *cis* et *trans* du DOPC. Finalement, la différence d'adhésion d'O157:H7 WT entre POPC et egg-PC n'est pas significative, contrairement aux autres lipides testés (Figure 70). Ce résultat peut s'expliquer par la proportion majoritaire de POPC dans le mélange egg-PC (Figure 55). La présence d'une insaturation supplémentaire sur DOPC, qu'il soit pur ou en mélange avec POPC, conduit à la même réduction qu'observée précédemment (Figure 68). A noter, la différence d'isomérisation sur DOPC n'a pas d'effet sur l'adhésion. En revanche de manière remarquable, le 18:3 PC diminue l'adhésion des bactéries O157:H7 WT à une adhésion trois fois moins élevée que celle sur POPC.

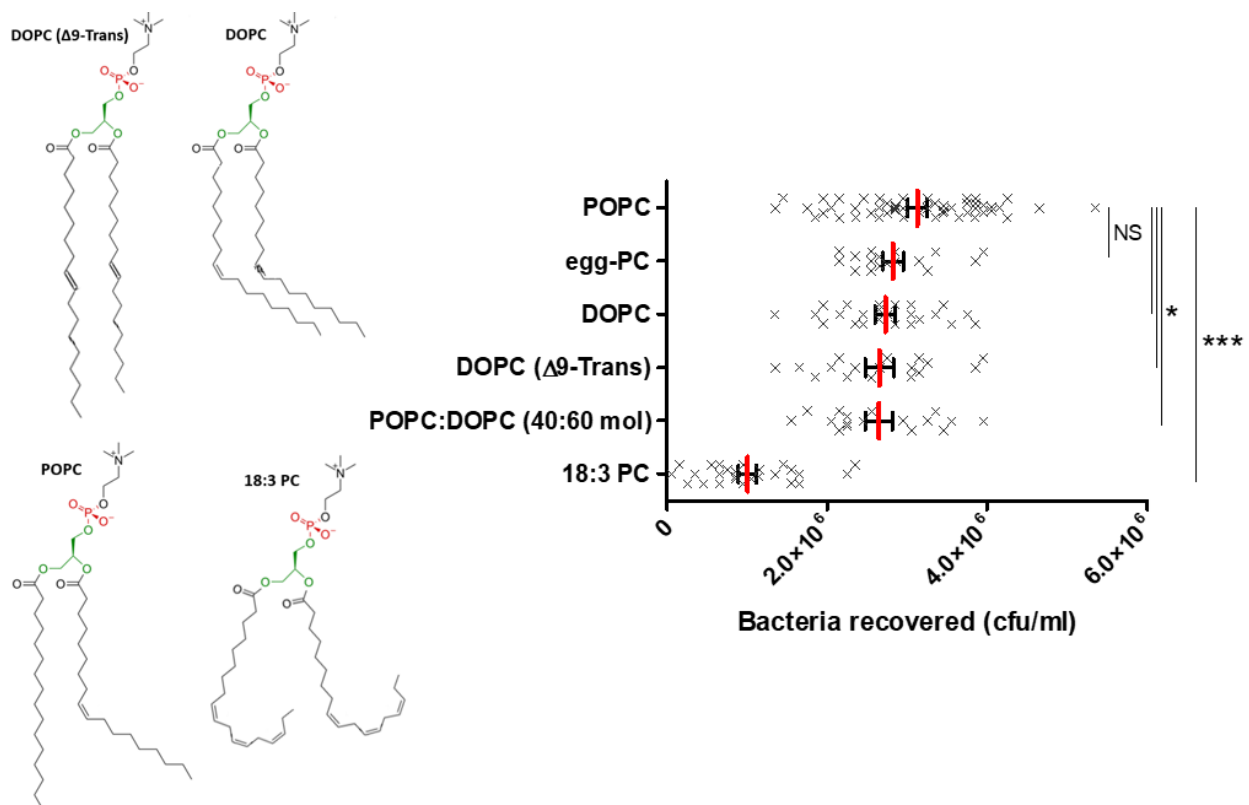


Figure 70 : Adhésion d'O157:H7 WT sur plusieurs phosphatidylcholines variant au niveau de leurs chaînes grasses. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; *: $P \leq 0,05$; NS : non significatif.

Au vu de cet effet marquant du 18:3 PC, nous souhaitons ensuite connaître l'impact des lipides polyinsaturés à l'échelle de la membrane cellulaire. Les entérobactéries, dont fait partie O157:H7, envahissent leur hôte par le biais de l'épithélium intestinal. Les cellules cancéreuses humaines du colon (lignée HT29) ont été choisies comme modèle cellulaire, et sécrètent également du mucus. De manière à ne récolter que la contribution de la membrane dans l'adhésion, l'expérience a été réalisée avant l'apparition des premières cellules caliciformes, responsables de la formation du mucus, à savoir avant l'atteinte de la confluence (Lesuffleur *et al.* 1993).

La composition en acide gras de la membrane plasmique des cellules HT29 a été modulée pour obtenir plusieurs lots de cellules, ayant des proportions enrichies notamment en acide linoléique C18:3 (acide linoléique). La membrane plasmique a la capacité, au travers de l'adaptation homéovisqueuse, d'adapter sa composition lipidique pour garder une fluidité appropriée, notamment face à des changements de température (Sinensky 1974). Celle-ci peut être influencée par l'apport exogène d'acides gras (Ibarguren *et al.* 2014). Ainsi, les cellules HT29 ont été mises en culture avec différents acides gras, C16:0 (acide palmitique) ou C18:3 durant 24 heures. Pour les cellules contrôles, la même quantité d'éthanol, solvant dans lequel sont dilués les acides gras, a été ajoutée dans le milieu. L'incorporation de ces acides gras a été ensuite évaluée par LC-MS. Par rapport aux cellules contrôles, les cellules complétementées avec du C16:0 présentent une augmentation de 10 % molaire en C16:0, tandis que celles en présence de C18:3 ont un enrichissement de quasiment 20 % molaire en C18:3 (Figure 71A). Ces apports en acide gras ont servi aux cellules en premier lieu à la synthèse de triglycérides (TAGs) (Figure 71E). Les TAGs sont des esters dérivés de glycérol et de 3 acides gras, ils constituent une réserve pour la cellule en acides gras, de même qu'en énergie (Birsoy *et al.* 2013). En parallèle, une hausse est observée chez les principaux phospholipides PC, PE et PS, constituant la membrane cellulaire (Figure 71B-D). Cependant, l'enrichissement au niveau des phospholipides du C16:0 est relativement plus faible par rapport au C18:3. Cette disparité au niveau de l'accumulation pourrait s'expliquer par la nécessité de la cellule d'acquérir cet acide gras, dont la seule possibilité d'obtention est par apport exogène. En effet, l'acide gras C18:3, appartenant aux Omega-3, n'est pas synthétisable par les mammifères, tout comme les Omega-6 (Nakamura et Nara 2004). Toutefois, face à ces incorporation en acides gras polyinsaturés, la membrane plasmique corrige sa fluidité en produisant plus de lipides saturés (K. R. Levental *et al.* 2018).

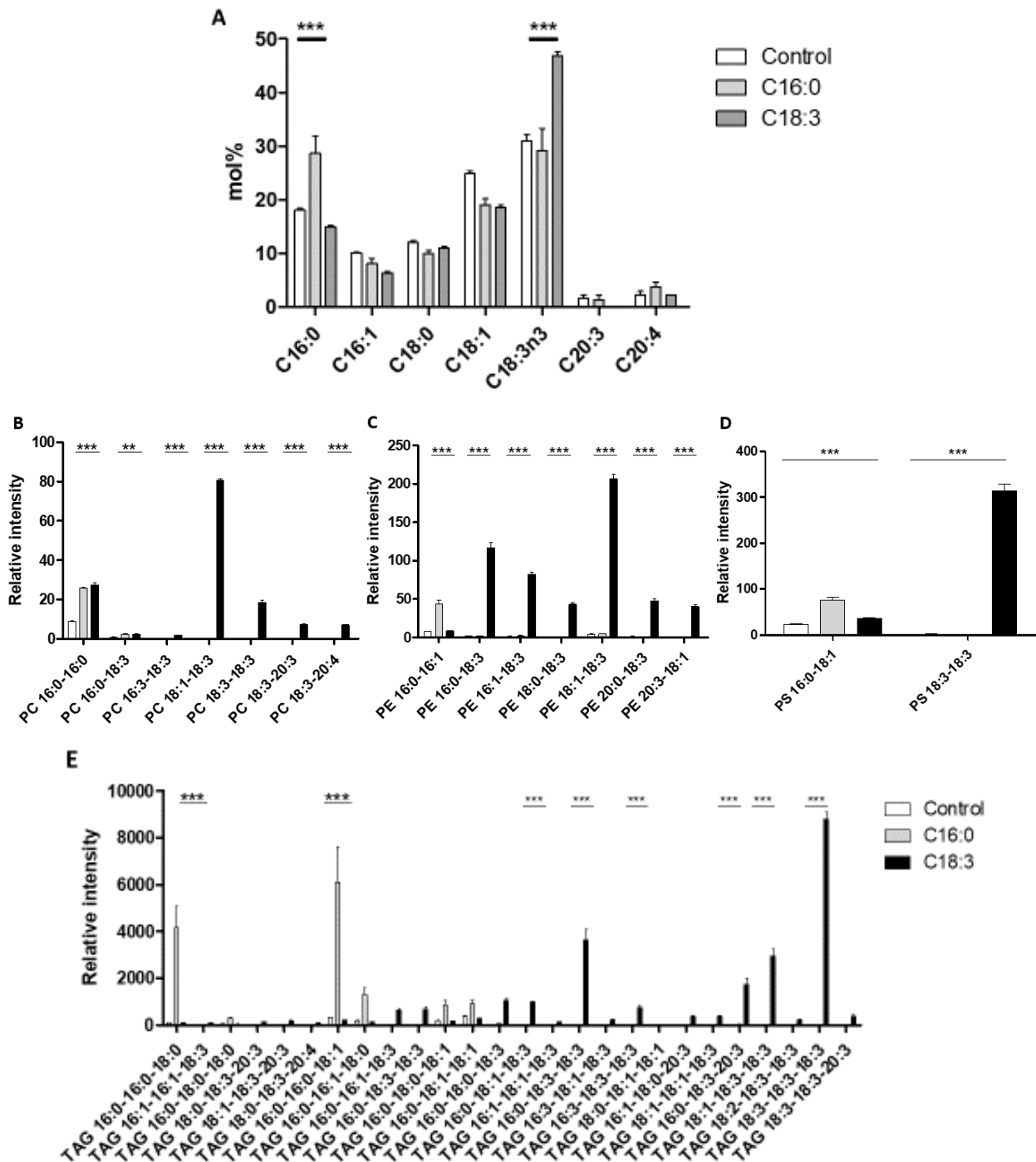


Figure 71 : Effet de la présence d'acides gras C16:0 ou C18:3 dans le milieu de culture sur la composition lipidique de HT29 en (A) acides gras totaux, phospholipides (B) PC, (C) PE, (D) PS et (E) TAGs. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P < 0,001$.

Après dénombrement bactérien sur cellules, nous avons constaté que l'incorporation d'acides gras C18:3 chez HT29 entraîne une diminution significative de l'adhésion pour O157:H7 WT, mais n'a pas d'effets significatifs pour la même bactérie non flagellée O157:H7 Δ fliC (Figure 72). Ce résultat démontre *in vitro* l'impact de la présence de poly-insaturations sur l'adhésion

bactérienne *via* le flagelle. Au contraire, l'incorporation d'acides gras C16:0 ne modifie pas significativement l'adhésion ni d'O157:H7 WT, ni d'O157:H7 Δ *fliC* (Figure 72). Néanmoins, ce résultat est à nuancer, puisque l'incorporation entre C18:3 et C16:0 n'est pas semblable (Figure 71).

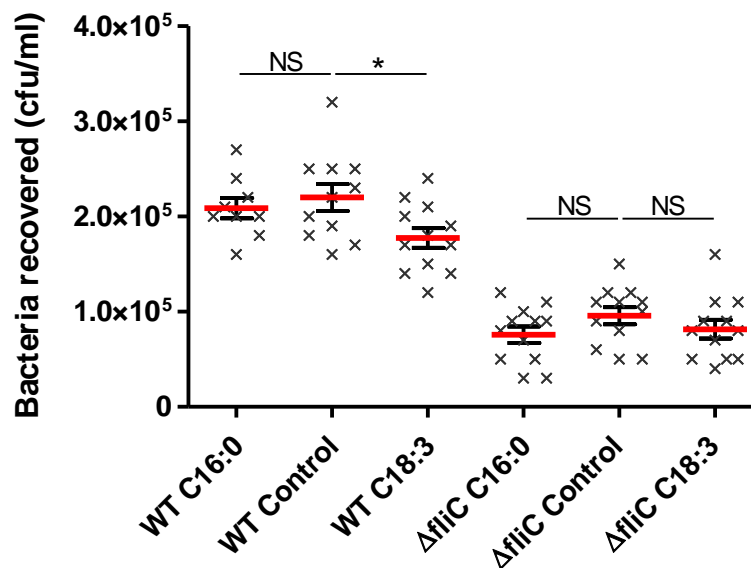


Figure 72 : Adhésion d'O157:H7 WT et Δ *fliC* sur cellules HT29 dont la composition lipidique a été modifiée. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : *: $P \leq 0,05$; NS : non significatif.

La présence de poly-insaturations, autant sur modèle biomimétique que sur modèle membranaire, limite l'adhésion de la bactérie *via* le flagelle. En effet, il n'a été observé *in vitro* aucune influence sur la souche non flagellée d'O157:H7 des acides gras C18:3. Cette diminution est apparentée à une aggrégation lipidique moins dense, provoquée par les nombreux coudes générés par les liaisons *cis* dans les chaînes carbonées.

4. Conclusion et sous-discussion

Les têtes polaires des lipides constituent le premier contact avec le flagelle. L'écart entre ces têtes est un élément crucial pour l'adhésion. Il est modulé soit par la taille de la tête polaire, par exemple naturellement petite, ou soit par l'empilement des chaînes carbonées plus en profondeur dans la bicouche lipidique (Figure 73).

D'après nos résultats, la charge portée par les têtes polaires pourrait influencer l'adhésion uniquement à certaines densités lipidiques, notamment dans des bicouches composées de lipides avec un acide palmitique et un acide oléique. POPG possède des liaisons hydrogènes inter-

et intramoléculaires, en particulier une liaison entre l'atome d'hydrogène sur un hydroxyle du glycérol et le groupe phosphate, qui entraîne une tête polaire quasi-parallèle à l'interface de la membrane (W. Zhao *et al.* 2007). *A contrario*, la stabilisation des charges négatives par la présence du contre-ion au niveau du carbonyle, augmente l'ordre lipidique (A. Dickey et Faller 2008). Etant donné que l'aire par lipide pour DOPC est plus importante, il se pourrait que ces interactions deviennent moins fortes et négligeables pour l'interaction bactérienne (Pan *et al.* 2014). Une réponse à cette hypothèse aurait pu être apportée en quantifiant l'adhésion bactérienne sur POTAP, lipide de synthèse avec une charge globale positive comprenant une chaîne palmitique et une chaîne oléique, et la comparer aux autres. Cette expérience n'a pas pu être réalisée, car ce lipide n'est pas disponible commercialement à ce jour.

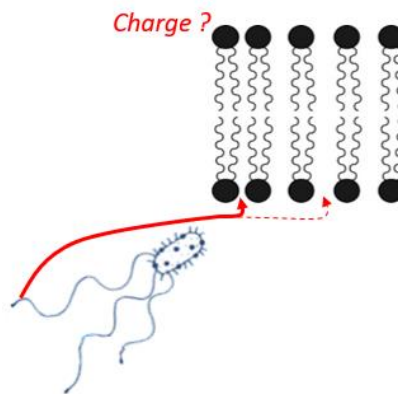


Figure 73 : Adhésion bactérienne via le flagelle dépend de l'ordre lipidique, avec un potentiel effet de la charge des lipides

La présence de poly-insaturations dans les chaînes carbonées des lipides diminue significativement l'adhésion bactérienne *in vitro*, sur modèles membranaires et sur cellules HT29. Les cellules HT29 sont un modèle de cellules épithéliales, car elles présentent en se différenciant des jonctions serrées entre cellules et des microvillosités en bordure de brosse sur la surface apicale. De plus, leur expression protéique, notamment des récepteurs cellulaires à la surface, est globalement équivalente aux cellules épithéliales. Compte tenu de ces caractéristiques, les cellules HT29 sont souvent utilisées comme modèle dans l'étude des infections bactériennes sur les cellules épithéliales intestinales (Martínez-Maqueda *et al.* 2015). Ici, nous avons pris soin de ne pas travailler dans des conditions permettant la différenciation des cellules HT29 en cellules mucosécrétantes, afin d'éviter la production de mucus. En effet, l'objectif de cette expérience était d'évaluer la modulation de la composition lipidique sur une véritable membrane plasmique et son impact sur l'adhésion bactérienne. Par rapport aux GUVs, le modèle cellulaire expose toute

une diversité lipidique et également d'autres processus cellulaires qui pourraient modifier cet effet.

L'impact de la consommation de lipides polyinsaturés, en particulier des Omega-3, est très étudié, notamment la production de sous-produits ayant des propriétés anti-inflammatoires ou sur le système immunitaire, et donc indirectement des effets sur l'infection bactérienne (Husson *et al.* 2016). Les Omega-3 ne sont pas synthétisables par l'homme par manque de désaturases *ad hoc* et doivent être apportés par l'alimentation (Nakamura et Nara 2004). D'après nos résultats, leur consommation pourrait avoir également un impact, cette fois-ci direct, sur l'adhésion bactérienne *in vivo*.

IV. Le flagelle en lien avec le cœur de la bicouche lipidique

Ce troisième chapitre est dédié à l'étude de l'interaction du flagelle plus profondément dans la bicouche lipidique, au niveau des chaînes carbonées. Jusqu'à présent, nous nous sommes focalisés sur l'agencement des lipides de la membrane au niveau des têtes polaires. Même si les chaînes carbonées sont impliquées de manière indirecte, le flagelle, au vu de sa longueur, pourrait être capable d'interagir directement avec elles, à la condition de s'insérer dans la membrane.

1. Interaction du flagelle avec les chaînes hydrophobes de la membrane

1.1. Modification de l'ordre lipidique par le flagelle

L'ordre lipidique correspond au niveau d'empilement des lipides au sein de la membrane. Ce paramètre est dynamique et évolue en fonction de l'environnement de la bicouche, en particulier lors d'interaction avec diverses molécules ou complexes protéiques. Ainsi, une modification de l'inter-espace entre lipides pourrait être une conséquence de l'insertion du flagelle. Nous avons donc suivi l'évolution de cet ordre lipidique en présence du flagelle, par mesure de l'hydratation de la bicouche. En effet, plus il y a d'espace entre les lipides, plus les molécules d'eau entrent aisément et inversement. Le taux d'hydratation est déterminé par la polarisation généralisée (GP) d'une sonde fluorescente sensible à la polarité environnante. La sonde Laurdan a été choisie car elle possède une longue chaîne carbonée, lui permettant de s'insérer dans le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique, son motif fluorescent naphthalène se situant au niveau du squelette glycérol des phospholipides (Figure 74A). De ce fait, si le flagelle

perturbe l'ordre lipidique à ce niveau, le changement de polarité modifiera l'intensité d'émission de fluorescence du Laurdan.

L'écartement des têtes polaires ayant été déterminé comme un des facteurs de l'adhésion, le suivi de l'ordre lipidique a été réalisé sur des liposomes d'egg-PC de tailles différentes : 400 nm, 1 μm , 2 μm et 7,5 μm . La courbure de la bicouche a en effet une influence notable sur ce paramètre. Les liposomes ont été préparés par extrusion sur membrane, exceptés pour les liposomes de 7,5 μm préparés par hydratation assistée par gel. Pour les liposomes inférieurs à 1 μm , leur taille a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, pour *Dynamic Light Scattering*). Pour les liposomes au-delà d'1 μm , leur taille a été établie par observation au microscope, en suivant la méthodologie précédemment décrite (Figure 67B). Chaque taille de liposomes ou vésicules donne lieu ainsi à une courbure propre de la bicouche lipidique, qui conduit à des empilements lipidiques différents. En effet, plus le rayon de courbure est élevé, plus les têtes polaires de la monocouche externe de la bicouche sont espacées (Risselada et Marrink 2009). Ceci a été confirmé en utilisant la GP du Laurdan sur toutes les populations de liposomes produites. Plus la taille est élevée, plus la GP du Laurdan augmente, ce qui traduit un espacement décroissant des lipides entre eux (Figure 74B).

Dans un premier temps, cette expérience a été réalisée avec les bactéries O157:H7 WT et ses mutants $\Delta fliC$ et $\Delta motA$. Malheureusement la présence de ces dernières dans le milieu entraîne des fluctuations au niveau du signal de la sonde, rendant les résultats inexploitable. Pour pallier ce problème, nous avons travaillé directement avec le flagelle H7 provenant d'O157:H7 WT, purifié selon le protocole décrit dans la section *Matériels et Méthodes*. La présence et la pureté du flagelle H7 ont été confirmées par SDS-PAGE (Figure 74C). D'autre part, afin de comparer plus aisément l'évolution de la GP du Laurdan entre les différentes tailles de liposomes, les résultats ont été normalisés et exprimés en ΔGP . Celui-ci correspond à la GP mesurée à une concentration donnée de flagelles à laquelle est soustraite GP_0 , la GP obtenue au début de l'expérience avant ajout de flagelles. Au préalable, la stabilité des liposomes durant toute la durée de l'expérience, a été vérifiée, de même que l'absence d'une interaction entre le flagelle et le Laurdan, qui conduirait à une modification de l'émission de ce dernier (Figure 91, cf. *Annexe des résultats*).

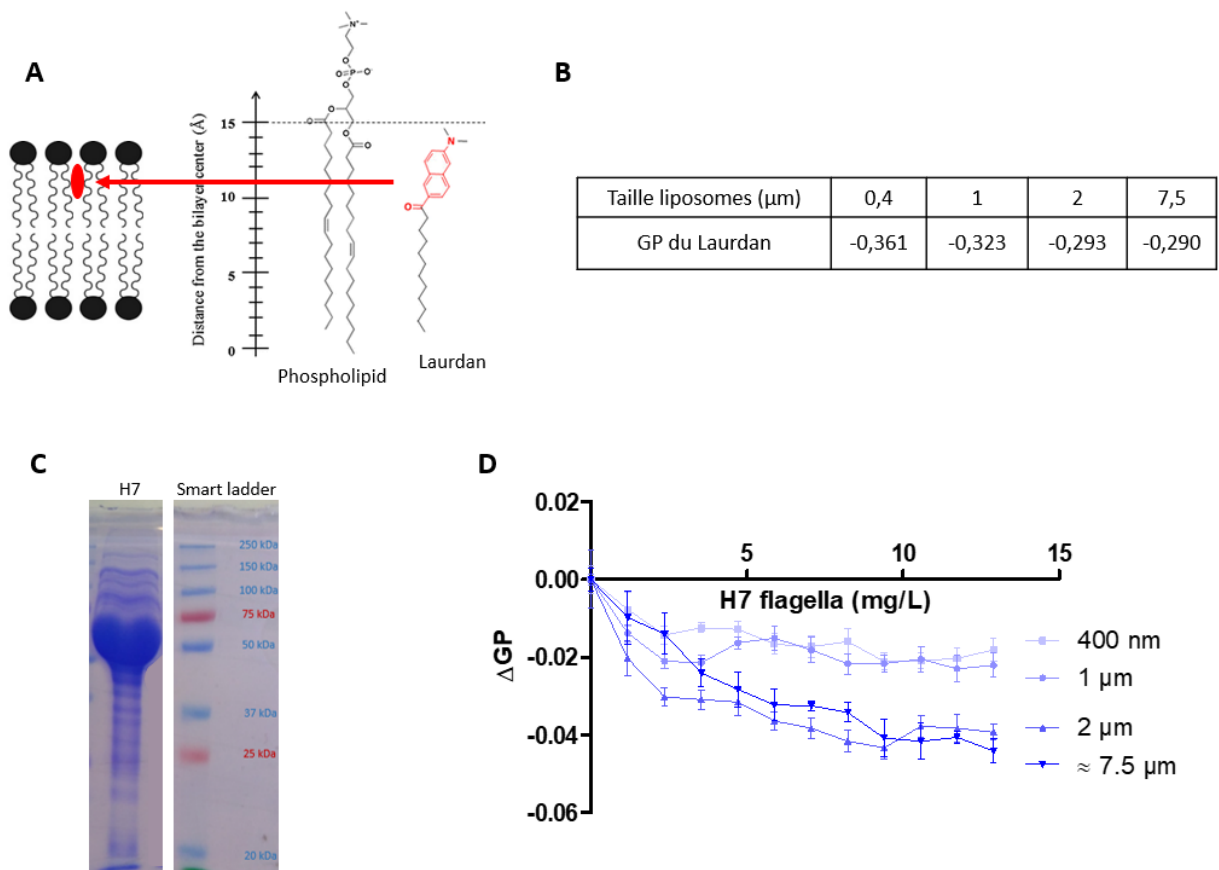


Figure 74 : Polarisation généralisée du Laurdan en présence de flagelles H7 sur liposomes d'egg-PC de différentes tailles. (A) Positionnement du Laurdan au sein de la bicouche lipidique. (B) GP du Laurdan de plusieurs tailles de liposome egg-PC. La moyenne a été calculée à partir de trois expériences indépendantes. (C) SDS-PAGE de flagelles purifiés à partir d'O157:H7 WT. (D) Evolution du ΔGP du Laurdan en présence de flagelle H7. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Une diminution de l'ordre lipidique est observée dès 1,18 mg/L de flagelles H7. A partir de 4,71 mg/L, les effets se distinguent sur deux populations : les liposomes les plus petits de 400 nm et 1 µm ont un ordre lipidique diminuant davantage que celui des liposomes des diamètres 2 µm et 7,5 µm. Ces observations démontrent qu'il y a une augmentation de l'écartement entre les lipides en présence du flagelle, dont l'effet est plus fort sur les liposomes de plus grands diamètres. De manière analogue, l'adhésion bactérienne est également dépendante de la taille des liposomes (Figure 75A-B). En effet, l'adhésion sur des GUVs de 7,5 µm par rapport aux liposomes de 400 nm diminue d'un facteur 10 pour O157:H7 WT et d'un facteur de 4 pour ST.

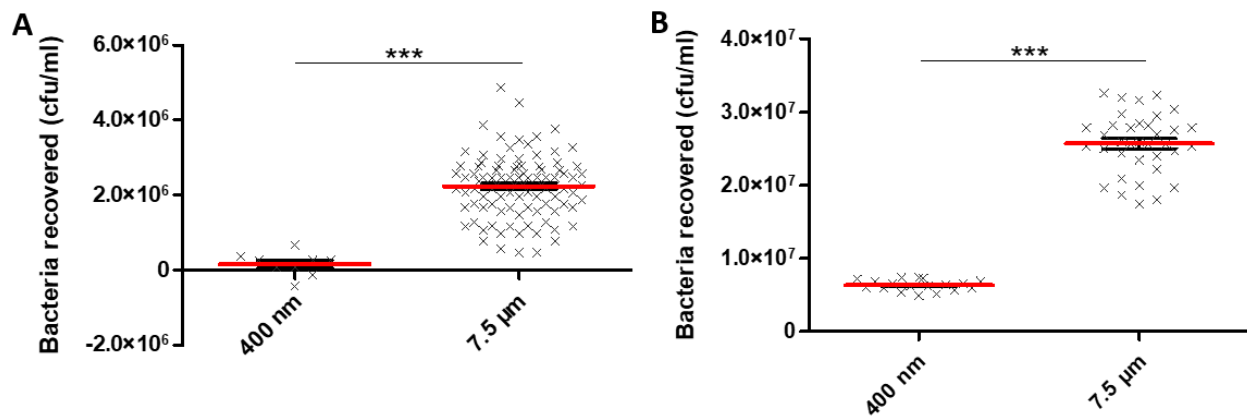


Figure 75 : Adhésion de (A) EHEC O157:H7 et (B) ST sur des liposomes egg-PC mesurant 400 nm et 7,5 µm. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$.

Cette diminution de l'ordre lipidique provoquée par une adhésion bactérienne plus élevée pourrait trouver son origine dans l'insertion du flagelle dans la membrane, au-delà des têtes polaires.

1.2. L'hydrophobicité module l'adhésion bactérienne

Si le flagelle s'insère dans la membrane, l'interaction avec les lipides à l'intérieur de la bicouche serait probablement de même nature que les chaînes carbonées entre elles, à savoir sur la base d'interactions hydrophobes. Chez *Salmonella*, il existe une modification post-traductionnelle, la méthylation, qui pourrait potentiellement modifier l'hydrophobicité du flagelle. Cet aspect fait actuellement l'objet d'une étude menée en collaboration avec Dr. Marc Erhardt du Centre de Recherche d'Infection de Helmholtz à Berlin (publication en cours de révision, disponible en section *Publications scientifiques issues de cette thèse*). Ce travail commun porte sur la méthylation du flagelle de *Salmonella* en tant que facteur de virulence. Une des enzymes impliquées dans la méthylation du flagelle est FliB, dont le gène appartient à un opéron de classe II du régulon flagellaire (J. Frye *et al.* 2006). Par conséquent, FliB est déjà présente avant la transcription de la flagelline, puisque l'opéron *fliC* est un opéron de classe III (cf. *Synthèse Bibliographique*). Nos collaborateurs ont identifié que cette enzyme prend en charge 17 des 22 résidus de lysines méthylées caractérisées pour FliB, et 17 sur 19 pour FliC (données en cours de publication). Ces lysines se situent pour la plus grande majorité dans les domaines D2-D3 de la flagelline, c'est-à-dire sur les parties exposées du flagelle (cf. *Synthèse Bibliographique*). Même si ces quelques sites sont mineurs face aux plus de 400 acides aminés que compte la flagelline, il n'en demeure pas moins que le flagelle peut contenir jusqu'à 20 000

unités de flagelline. D'autre part, l'impact de la méthylation sur l'interaction avec la bicouche lipidique peut être directement étudiée *in situ* à l'aide de mutants *fliB*.

Avant toutes choses, il faut savoir si la présence répétée de quelques résidus méthylés modifie l'hydrophobicité globale du flagelle. Pour ce faire, plusieurs flagelles de ST ont été préalablement purifiés. Ils proviennent de souches n'ayant pas de variation de phase, de manière à n'obtenir que des extraits de flagelles possédant un seul type de flagelline, soit FliC ou soit FljB. Pour les souches dont le gène *fliB* a été délété, des flagelles non méthylés sont recueillis, respectivement FliC Δ *fliB* et FljB Δ *fliB*. Leur hydrophobicité a été déterminée grâce à l'utilisation du Prodan, une sonde fluorescente hydrophobe aromatique. Plus le flagelle est hydrophobe, plus sa complexation avec cette sonde entraîne un déplacement vers la longueur d'onde maximale d'émission, et ainsi une intensité d'émission plus importante. Les intensités obtenues en fonction des concentrations croissantes de flagelles ont été tracées. Le coefficient directeur de la droite obtenu, appelé surface d'hydrophobicité S_0 , est directement proportionnel à l'hydrophobicité du flagelle (Haskard et Li-Chan 1998). Ainsi, que ce soit pour FliC ou FljB, la délétion de *fliB* à l'origine de la méthylation du flagelle résulte en un flagelle moins hydrophobe (Figure 76).

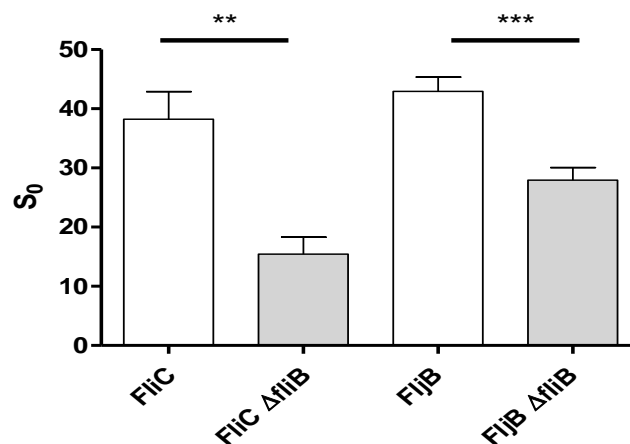


Figure 76 : Détermination de l'hydrophobicité des flagelles méthylés FliC et FljB et des flagelles non méthylés FliC Δ *fliB* et FljB Δ *fliB*, purifiés à partir de plusieurs souches de ST. S_0 correspond à l'hydrophobicité de surface déterminée par le Prodan. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***, $P \leq 0,001$; **, $P \leq 0,005$.

L'étape suivante porte sur la comparaison de l'adhésion des souches ST présentées dans le premier chapitre de la section *Résultats et Discussion*, avec celles de leur mutant respectif Δ *fliB*. Les niveaux d'adhésion obtenus montrent que l'absence de la méthylase FliB entraîne, à l'exception de ST Δ *flgKL*, une diminution significative de l'adhésion, même chez ST Δ *motAB* Δ *fliB* (Figure 77A). Etant donné que la motilité du flagelle affecte l'adhésion bactérienne (Figure 65A-

B), nous avons vérifié que la délétion de *fliB* n'entraîne pas d'effets significatifs au niveau de la motilité des bactéries (Figure 77B) (Deditius *et al.* 2015). Le niveau d'adhésion similaire entre les bactéries non flagellées, ST $\Delta flgKL$ et ST $\Delta flgKL\Delta fliB$, confirme que les résultats observés sont bien liés aux caractéristiques du flagelle modifié par FliB.

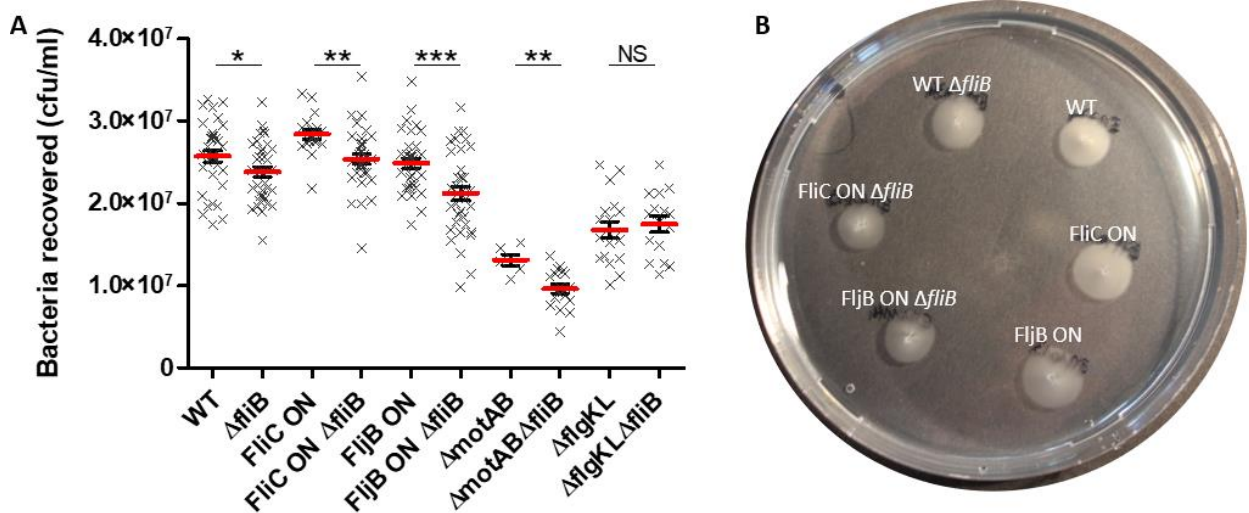


Figure 77 : Adhésion de plusieurs souches de ST avec leur mutant respectif $\Delta fliB$ sur GUVs egg-PC, ainsi que leur motilité. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,005$; *: $P \leq 0,05$; NS : non significatif.

Cette diminution de l'adhésion pour les mutants $\Delta fliB$ est corrélée au fait que ces derniers possèdent un flagelle moins hydrophobe, qui serait donc moins en mesure d'interagir avec les chaînes hydrophobes de la bicouche lipidique. Il est donc possible que le flagelle interagisse avec les chaînes carbonées des lipides grâce à des interactions hydrophobes. Par conséquent, l'interaction pourrait être sensible à l'état des lipides, dont les caractéristiques physiques varient fortement.

2. Hétérogénéité de l'adhésion du flagelle en fonction de l'état physique de la membrane

2.1. L'adhésion bactérienne est sensible à la fluidité de la membrane

Les phospholipides peuvent s'agencer dans la bicouche sous deux états physiques principaux, appelés solide ordonné ou phase gel et liquide désordonné ou phase fluide (cf. *Synthèse Bibliographique*). Ces deux états, dont la transition intervient à une température de transition T_m propre à chaque lipide, présentent des ordres lipidiques et des fluidités membranaires bien distincts et ainsi, une variabilité potentielle au niveau de l'adhésion

bactérienne. La fluidité membranaire correspond à la diffusion plus ou moins libre des constituants de la membrane, en l'occurrence ici les lipides, au sein de celle-ci.

Le DPPC, composé de deux chaînes palmitiques, possède une température de transition de 41°C. Celui-ci a l'intérêt de permettre facilement l'étude du passage de l'état gel à l'état fluide. Ainsi, nous avons suivi le changement d'état de liposomes composés de DPPC par GP du Laurdan, en présence ou non de flagelles. Les liposomes, obtenus par extrusion, présentent une taille intermédiaire de 2 µm et sont exposés à une variation de température allant de 25°C à 65°C. Au final, les courbes obtenues avec et sans flagelles se superposent, démontrant aucun effet du flagelle sur l'ordre lipidique de liposomes DPPC, même à l'état fluide (Figure 78). Lors d'un précédent suivi de la GP du Laurdan sur des liposomes d'egg-PC de même taille, une diminution de l'ordre lipidique a été au contraire observée en présence de la même concentration de flagelles (Figure 74B). Pourtant à une température de 55°C, les liposomes de DPPC présentent une GP du Laurdan proche de celle des liposomes d'egg-PC à -0,293, et donc un ordre lipidique similaire (Figure 74B). De façon plus générale, ces deux lipides possèdent des différences structurales au niveau de leurs chaînes carbonées. L'absence d'insaturations sur les chaînes carbonées de DPPC conduit à une force d'interaction entre lipides plus forte que dans le mélange egg-PC. Par conséquent, la mobilité des lipides au sein de la membrane, appelée fluidité membranaire, est plus contrainte chez DPPC. Finalement, l'adhésion du flagelle dépendrait aussi de la fluidité de la membrane.

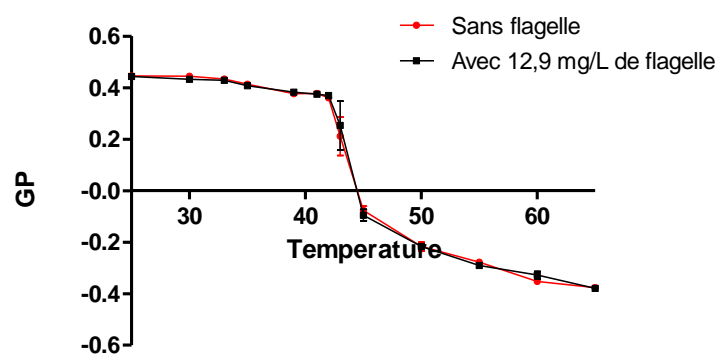


Figure 78 : Evolution de l'ordre lipidique de DPPC par GP du Laurdan en présence ou non de flagelles H7. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi un lipide dont la température de transition permettrait de réaliser des tests d'adhésion sur GUVs à des conditions expérimentales raisonnables au niveau de la température. Nous avons sélectionné le DOPC en configuration *trans*, déjà utilisé précédemment, dont la température de transition atteint 12°C. La mesure de la fluidité membranaire a été comparée avec l'adhésion d'O157:H7 WT à des températures bien

précises : plusieurs degrés en-dessous et au-dessus de la T_m , respectivement à 4°C et 23°C, et également à la température physiologique de l'hôte de la bactérie, 37°C.

La fluidité membranaire de liposomes de DOPC *trans* d'un diamètre de 2 μm a été déterminée par mesure d'anisotropie du Laurdan et du Prodan, dont les positions au sein de la membrane diffèrent (Figure 79B). L'anisotropie mesure la dépolarisation de fluorescence, qui est causée par la rotation des sondes fluorescentes dans la membrane. Plus la sonde est mobile, plus l'anisotropie diminue. A 4°C, la fluidité est minimale notamment à cause d'un empilement ordonné des lipides, caractéristique d'une phase gel. La fluidité augmente avec la température de la même façon au niveau et sous le squelette de glycérol, mais avec une variation plus marquée entre les deux phases, qu'au sein d'une même phase. En effet, l'anisotropie diminue de 20% entre 4°C et 23°C, contre 8% entre 23°C et 37°C (Figure 79B).

Concernant les niveaux d'adhésion, la température entraîne des disparités significatives, en particulier, O157:H7 WT adhère plus à 23°C qu'à 4°C (Figure 79A). En milieu non visqueux, la rotation du flagelle est affectée par la température, en jouant potentiellement sur le transfert de protons, la source d'énergie du moteur flagellaire (cf. *Synthèse Bibliographique*) (X. Chen et Berg 2000). Ainsi, l'adhésion plus faible observée à 4°C pourrait être plus ou moins liée à une diminution de la motilité, qui comme vu précédemment impacte l'adhésion bactérienne (Figure 65A). Cependant à 37°C, qui est la température optimale pour O157:H7, une réduction de l'adhésion, par rapport à 23°C, est observée. Une fluidité trop élevée est donc moins propice à l'adhésion bactérienne.

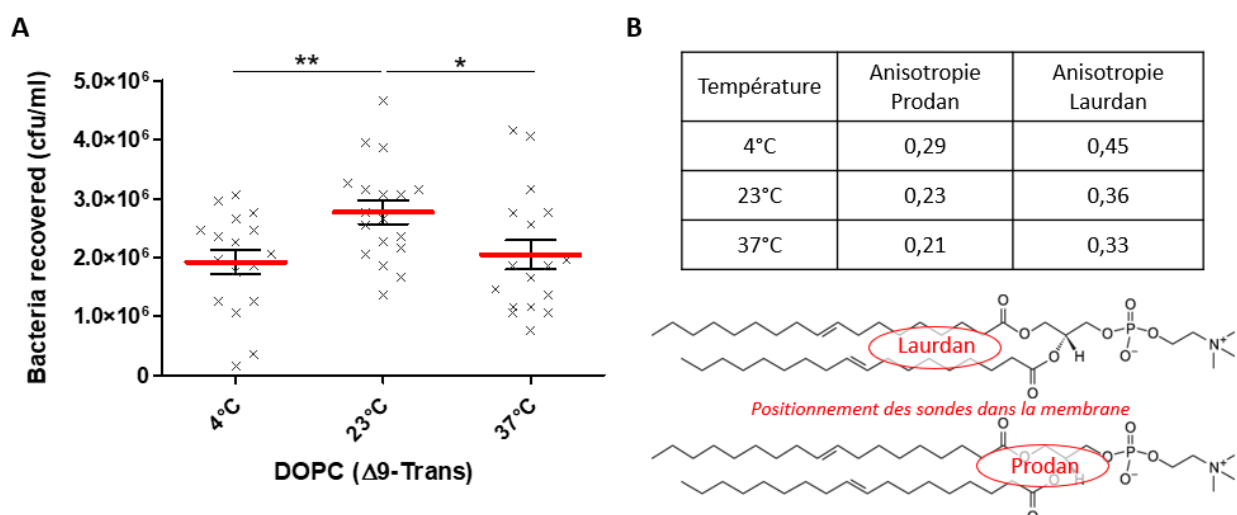


Figure 79 : Effet de la fluidité sur l'adhésion d'O157:H7 par utilisation du DOPC ($\Delta 9$ -Trans). (A) Adhésion d'O157:H7 WT sur GUVs DOPC ($\Delta 9$ -Trans) à différentes températures. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : **: $P \leq 0,005$; *: $P \leq 0,05$. (B) Anisotropie du Prodan et du Laurdan de liposomes DOPC ($\Delta 9$ -Trans) de 2 μm à chacune de ces températures. La moyenne a été calculée à partir de trois expériences indépendantes.

D'après les résultats rapportés ci-dessus, l'adhésion bactérienne est sensible à la fluidité de la membrane. Il semble qu'une fluidité intermédiaire serait optimale pour favoriser l'adhésion bactérienne *via* le flagelle. En effet une fluidité faible, qui traduit une interaction forte entre lipides, pourrait gêner l'interaction du flagelle avec les chaînes carbonées et sa potentielle insertion. En revanche, une mobilité trop élevée des lipides entraînerait une interaction insuffisante pour établir une adhésion pérenne.

2.2. Le flagelle, un atout potentiel dans l'adhésion sur les domaines lipidiques ordonnés

Les membranes biologiques, de par la richesse de leur composition lipidique, possèdent une fluidité localement hétérogène associée à la formation de domaines (cf. *Synthèse Bibliographie*). Ceux-ci présentent des états physiques précis de liquide désordonné et en présence d'une quantité suffisante de cholestérol de liquide ordonné. Ce dernier correspond à un état hybride entre les phases fluide et gel. Les domaines en liquide ordonné *in vitro*, par extension les potentiels radeaux lipidiques (*lipid rafts*), sont souvent décrits comme la cible des pathogènes. Ils abritent de nombreux récepteurs protéiques (clusters protéiques) et sont enrichis en sphingolipides ou en cholestérol (K. K. Lee *et al.* 1994; Lafont *et al.* 2002). Certaines bactéries possèdent d'ailleurs une forte affinité avec le cholestérol, plus présent dans ces zones (Garten *et al.* 2015).

Pour mimer les domaines en phase liquide désordonnée et ordonnée, ainsi que leur coexistence, nous avons réalisé des mélanges contenant les trois catégories principales de lipides retrouvés dans la membrane plasmique animale : POPC pour les phospholipides, la palmitoylsphingomyéline (PSM) pour les sphingolipides et le cholestérol. La reconstitution de ségrégation lipidique sur modèle biomimétique a été réalisée à partir d'un mélange équimolaire de ces 3 constituants, qui reste toujours très utilisé pour l'étude des radeaux lipidiques (Veatch et Keller 2003a; Dietrich *et al.* 2001). Ce mélange, nommé L_d/L_o , se compose à 80% de domaines en liquide ordonné (L_o) et se caractérise par de larges domaines en liquide désordonné (L_d) mesurant 75-100 nm dans une matrice L_o (de Almeida *et al.* 2005). Les compositions de L_o et L_d ont été déterminées grâce au diagramme ternaire POPC/PSM/Cholestérol (Figure 80).

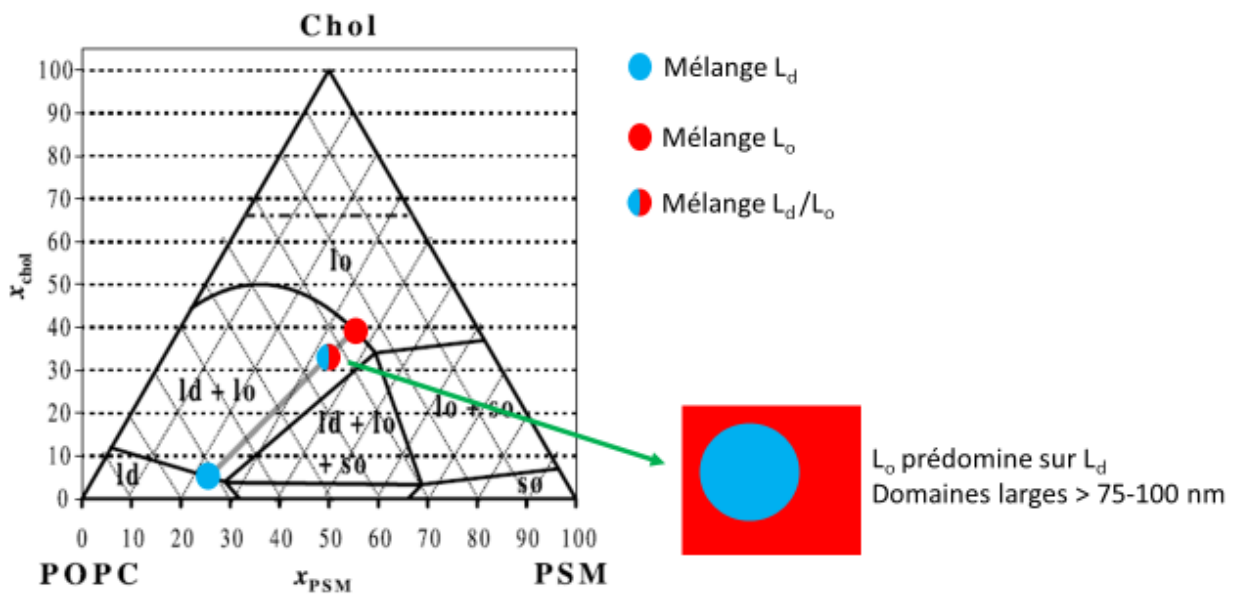


Figure 80 : **Diagramme ternaire POPC/PSM/Cholestérol à 23°C.** Le point bleu/rouge représente le mélange équimolaire nommé L_d/L_o , les points bleu et rouge donnent respectivement les compositions molaires de L_d et de L_o . La ligne tiret-point située à $x_{chol}=0,66$ correspond à la limite de solubilité du cholestérol dans les membranes de phosphatidylcholine. Adapté de de Almeida et al. 2005.

Contrairement aux autres lipides ou mélanges lipidiques précédents, la détermination de la composition exacte des GUVs à partir de L_d/L_o , L_d et L_o , ainsi que leur taux d'immobilisation ont dû être réalisés par LC-MS, de manière d'une part à quantifier séparément les phospholipides et les sphingolipides (Figure 90, Tableaux 5 et 6 cf. *Annexe des résultats*). D'autre part, la 1H RMN n'a pas pu être utilisée, car des signaux des phospholipides et du cholestérol se superposent. Enfin, la méthode en GC-FID qui est basée sur la détection d'esters méthyliques d'acide gras, n'est donc pas applicable non plus au cholestérol.

A l'issue des analyses, la composition des GUVs correspond à celle des mélanges préparés. Cependant pour L_d , elle atteint une proportion molaire en cholestérol de 10% au lieu de 5%, au détriment du POPC. Cette composition donne lieu, d'après le diagramme ci-dessus, à un état de coexistence de phases. Ayant une proportion de L_o très faible, ce mélange se caractérise par de minuscules domaines L_o inférieurs à 20 nm dans une matrice L_d (Figure 80). La formation des GUVs par hydratation assistée par gel étant sensible à l'état physique du mélange lipidique, il se pourrait que la composition théorique L_d ne favorise pas la formation de GUVs. En effet, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée en détail à la formation de GUVs assistée par gel à partir de différents mélanges de cholestérol/sphingolipide/glycérolipide (Weinberger *et al.* 2013). Nous avons cependant bien obtenu des GUVs pour chaque mélange préparé (Figure 90, cf. *Annexe des résultats*).

L'adhésion sur les mélanges L_d/L_o , L_d et L_o est très variable, autant pour O157:H7 WT que pour O157:H7 $\Delta fliC$. Celle-ci a été tout d'abord comparée avec l'adhésion obtenue avec le phospholipide de référence POPC. Tout comme sur les phospholipides, l'adhésion d'O157:H7 WT sur le mélange L_d/L_o , qui expose une ségrégation de phase en contenant d'autres types de lipide, est significativement plus importante que celle d'O157:H7 $\Delta fliC$ (Figure 81A). D'après les niveaux d'adhésion sur mélanges L_d et L_o des souches WT et $\Delta fliC$, les bactéries qu'elles soient flagellées ou non adhèrent davantage sur les phases liquides désordonnés qu'ordonnés. Néanmoins, les bactéries flagellées adhèrent plus sur les domaines liquides ordonnés par rapport aux mutants aflagellés, alors qu'il n'y a pas de différences significatives d'adhésion sur les domaines liquides désordonnés. Au niveau de la coexistence de domaines, l'adhésion mesurée pour O157:H7 WT est bien supérieure à l'adhésion prédite d'après ses adhésions respectives sur L_o et L_d . Cette adhésion prédite est calculée en tenant compte des proportions des domaines liquides désordonnés et ordonnés présents. De manière plus précise, elle est déterminée en additionnant 80% du niveau d'adhésion obtenu sur le mélange L_o avec 20% du niveau d'adhésion mesurée sur le mélange L_d (Figure 81B). Cette tendance n'est en revanche pas observée pour son mutant non flagellé. Compte tenu de ces résultats, le flagelle semble être impliqué dans une adhésion spécifique à la combinaison de domaines L_d et L_o .

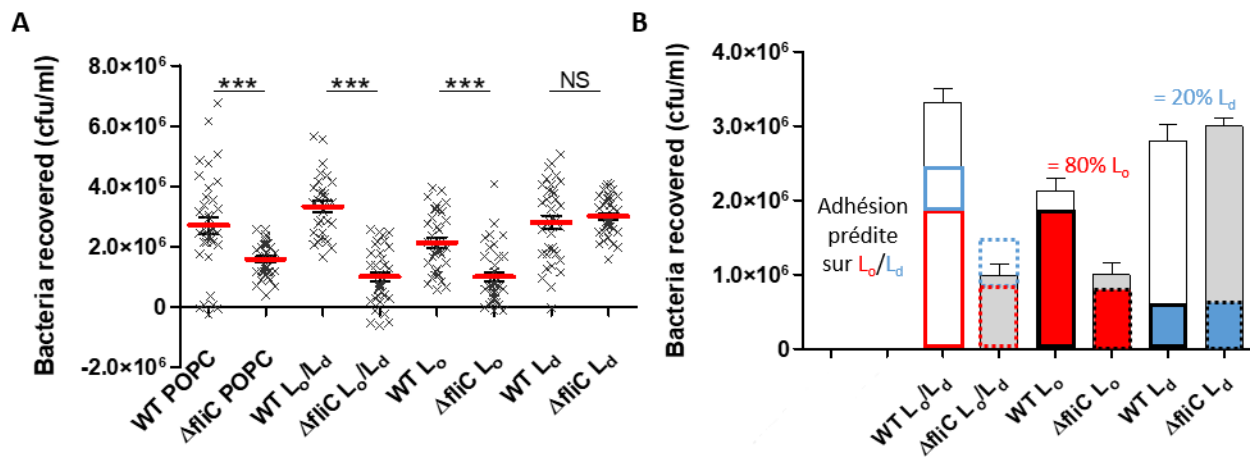


Figure 81 : Etude de l'adhésion d'O157:H7 WT et $\Delta fliC$ sur des GUVs mimant la ségrégation lipidique. (A) Adhésion sur les GUVs formées à partir de phospholipides seuls POPC et des mélanges L_d/L_o , L_o et L_d constitués de POPC, PSM et cholestérol. (B) Comparaison de l'adhésion sur L_d/L_o mesurée, avec celle prédite à partir de L_d et L_o . La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test t de Student et est représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; NS : non significatif.

En adhérant mieux sur les domaines liquides ordonnés, le flagelle semble favoriser l'adhésion des bactéries sur des surfaces possédant une fluidité membranaire plus faible, et par conséquent conquérir davantage les potentiels radeaux lipidiques. Il est intéressant de souligner

que lors de la ségrégation lipidique, une adhésion plus importante se produit. Les caractéristiques physiques de l'interface, notamment la tension de ligne, entre les domaines L_o et L_d pourraient également être favorable à l'adhésion du flagelle.

3. Conclusion et sous-discussion

L'hydrophobicité est un paramètre de l'adhésion du flagelle sur la bicouche lipidique, celui-ci interagirait donc directement avec les chaînes carbonées, sous-entendant son insertion dans la membrane (Figure 82). D'autant plus que l'hydrophobicité, impliquée dans cette liaison, a déjà été décrite dans l'adhésion *via* le flagelle sur des surfaces abiotiques ou *in planta* (Bruzard *et al.* 2015; Mittelviehhaus *et al.* 2019). Une étude a même démontré la capacité de bactéries flagellées à stabiliser une émulsion, contrairement aux bactéries non flagellées (Friedlander *et al.* 2015).

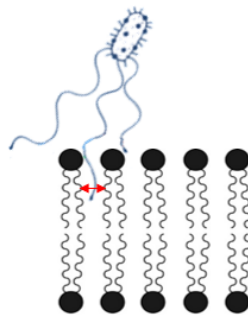


Figure 82 : Insertion potentielle du flagelle et interaction avec les chaînes hydrophobes de la membrane

Un autre argument en faveur d'une potentielle insertion du flagelle est la dépendance de l'adhésion bactérienne aux caractéristiques physico-chimiques des chaînes carbonées, en particulier de la fluidité membranaire (Figure 83). Même si les domaines liquides ordonnés, et potentiellement les radeaux lipidiques, sont décrits comme des sites favorables pour les pathogènes, la matrice lipidique seule n'est pas propice à l'adhésion bactérienne, d'après nos résultats. En revanche, leur absence peut parfois compromettre l'adhésion, notamment celle d'UPEC par le biais des pili de type I sur l'urothélium, car ces domaines ordonnés interviennent dans la conformation de leur récepteur (Duncan *et al.* 2004). La limite entre les domaines ordonnés et les domaines désordonnés semblent être à l'origine d'une adhésion *via* le flagelle. La particularité de ces régions est l'incompatibilité entre les épaisseurs de ces deux types de domaine, qui conduit à une énergie interfaciale appelée tension de ligne (Kuzmin *et al.* 2005). L'attachement de certaines protéines sur ces zones pourrait être guidé par une stabilisation et une diminution de cette tension (Hutchison *et al.* 2012). D'après nos résultats, la composition

lipidique seule est capable de moduler l'adhésion bactérienne, sans l'intervention de d'autres constituants de la membrane.

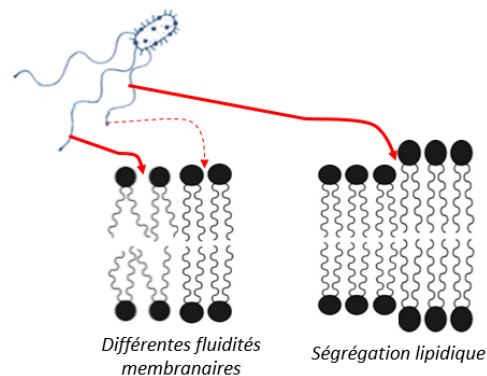


Figure 83 : Hétérogénéité de l'adhésion bactérienne due à la diversité de fluidité membranaire et une possibilité d'interaction spécifique du flagelle à la frontière des domaines ordonnés et désordonnés

V. L'adhésion du flagelle sur la cellule, étape par étape

Ce dernier chapitre a pour objectif de comprendre de manière globale l'apport de chaque paramètre physique de la bicouche lipidique identifiés dans le processus d'adhésion, à savoir l'écartement des têtes polaires et de la fluidité membranaire. Avec ces données, d'autres caractéristiques physiques obtenues grâce à des simulations par dynamique moléculaire ont été analysées, pour établir des régressions entre ces variables. Enfin pour aller plus loin, une fois lié à la membrane, l'action du flagelle dans le processus d'adhésion ne s'arrêterait pas à son interaction avec la bicouche lipidique et pourrait continuer au niveau du cytosquelette.

1. Importance relative des facteurs impliqués dans le processus adhésion sur la membrane

Dans les précédents chapitres, l'écartement des têtes polaires et la force d'interaction entre les chaînes carbonées, associée à la fluidité membranaire, ont été identifiés comme des paramètres régissant en proportions variables l'adhésion du flagelle sur la membrane. Pour connaître leur contribution respective ainsi que les relations qui peuvent les lier, nous avons regroupé toutes les données déjà acquises sur chaque type de bicouche. Ensuite, grâce à la collaboration du Pr. Patrick Trouillas (Equipe INSERM U1248, CHU de Limoges), des caractéristiques physiques supplémentaires des bicouches lipidiques ont été évaluées par simulation de dynamique moléculaire. Il s'agit de l'épaisseur de membrane mesurée entre deux atomes proches de phosphore entre les deux feuillettes lipidiques, la distance pic à pic déterminée

par rapport au profil de la densité électronique, l'aire des lipides et la force d'interaction entre les chaînes carbonées, qui est d'autant plus forte que la valeur obtenue est négative. Tous ces paramètres ont été calculés dans un système de simulation comportant une bicouche de 128 molécules de lipides, dans un environnement hydraté d'une même salinité que les tests d'adhésion (Figure 84). Toutefois, les caractéristiques physiques des membranes de certains lipides, comme le 18:3 PC ou les mélanges POPC/PSM/Cholestérol, n'apparaissent pas encore car ils n'existent pas actuellement dans les bases de données utilisées pour ce type de simulation. Leur création nécessite l'utilisation d'un autre champ de force et amène à recalculer une majorité de caractéristiques. Ces données ne seront malheureusement pas encore disponibles avant la fin de ma thèse.

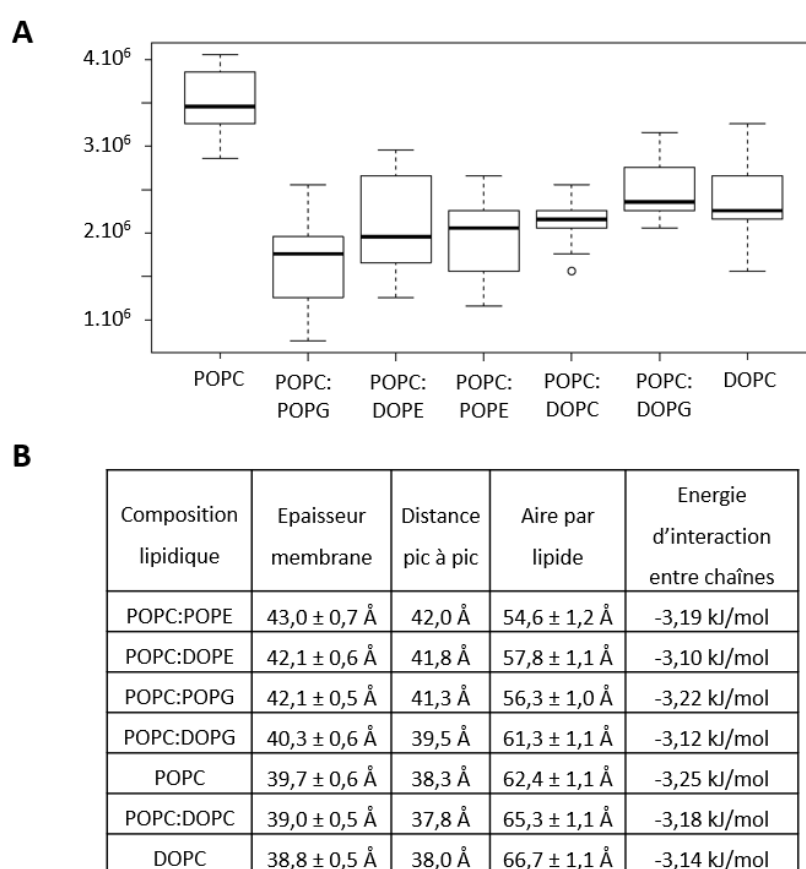


Figure 84 : **Compilation des caractéristiques obtenues pour chaque membrane.** (A) Niveaux d'adhésion d'O157:H7 WT en CFU/ml. (B) Caractéristiques physiques des membranes.

L'ensemble de ces informations a ensuite été traité *via* une analyse de corrélation (produit-moment) de Pearson. Ce calcul a été réalisé par le Dr. Fady Mohared de l'Université de Cranfield. Cette corrélation permet d'évaluer si l'évolution d'une variable est bien corrélée de manière linéaire à une autre et aussi de quantifier le niveau de corrélation, donnant lieu un coefficient compris entre -1 et +1. Un coefficient positif traduit une évolution dans le même sens, à savoir si

une variable augmente, la deuxième augmente également. En revanche pour un coefficient négatif, la hausse de la première variable entraîne une diminution de la deuxième. Plus le coefficient est proche de 0, plus les variables sont linéairement indépendantes, *a contrario* lorsque la valeur tend vers ± 1 , la relation entre les deux variables est proportionnelle. Pour des coefficients intermédiaires, le niveau de corrélation entre les deux valeurs est qualifié de :

- « large » entre ± 1 et $\pm 0,5$
- « moyenne » entre $\pm 0,5$ et $\pm 0,3$
- « petite » entre $\pm 0,3$ et $\pm 0,1$.

De manière attendue, l'épaisseur de la membrane et la distance pic à pic sont linéairement proportionnelles, car la distance pic à pic est un autre moyen d'obtenir l'épaisseur de la membrane (Figure 85). L'aire par lipide est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la membrane. En effet, lorsque les lipides occupent un espace plus grand, leurs chaînes sont désordonnées et s'étalent donnant moins d'épaisseur à la membrane. Au niveau des corrélations linéaires avec l'adhésion, cette dernière possède une association large avec l'aire par lipide, et donc inverse à l'épaisseur de la membrane. En revanche, le potentiel d'interaction des chaînes carbonées présente une association d'intensité moyenne inverse à l'adhésion, autrement dit une interaction plus forte entre les chaînes carbonées entraîne une adhésion bactérienne moins élevée. Au final, l'écartement des chaînes carbonées semble avoir un impact plus important sur l'adhésion, que l'interaction des chaînes carbonées et par conséquent la fluidité membranaire. Cette hiérarchisation semble plutôt logique, puisque le flagelle doit déjà s'insérer dans la membrane grâce à l'écartement des têtes polaires, avant d'interagir avec les chaînes carbonées.

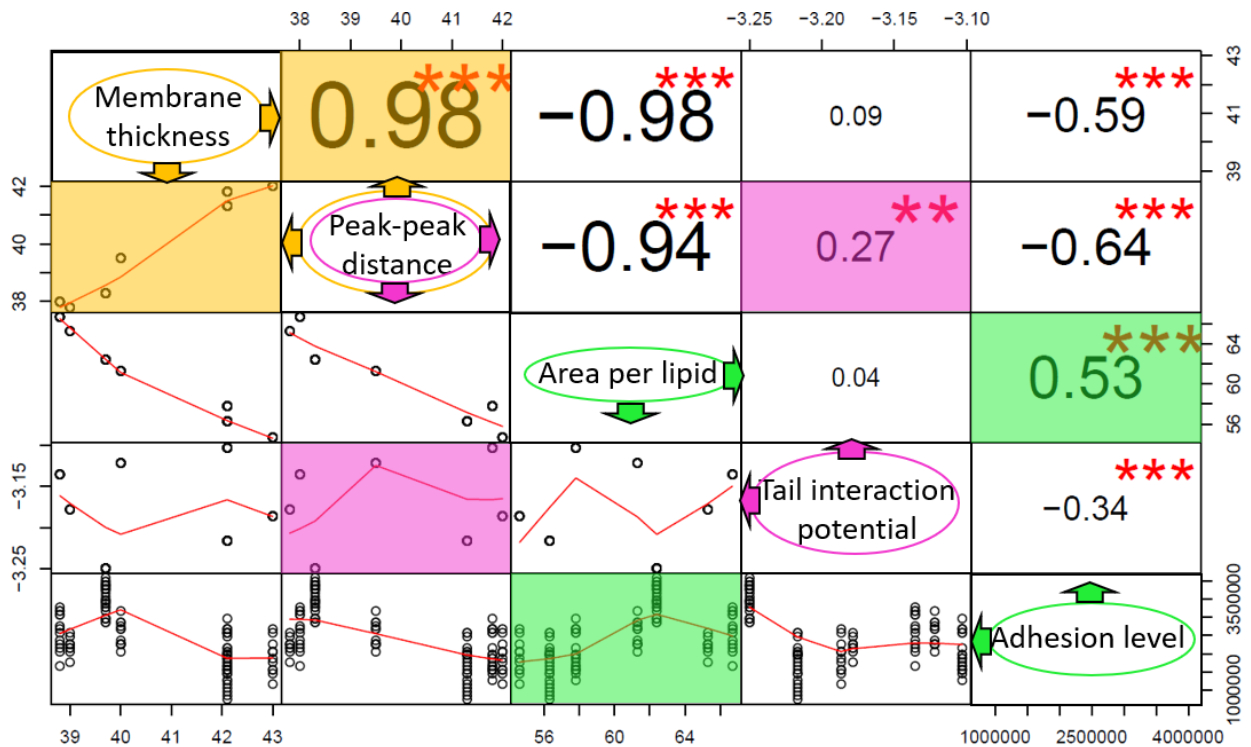


Figure 85 : Corrélation de Pearson entre l'épaisseur de la membrane, la distance pic à pic, l'aire par lipide, le potentiel d'interaction entre les chaînes carbonées et les niveaux d'adhésion d'O157:H7 WT. Les représentations graphiques des corrélations sont visibles dans la partie inférieure, tandis que les coefficients de corrélation sont donnés dans la partie supérieure de la figure. La significativité de ces derniers sont représentée comme suit : ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; \emptyset : non significatif. Trois exemples de corrélation sont mis en avant par couleur.

Cependant, les résultats obtenus avec le 18:3 PC contredisent les relations linéaires décrites ci-dessus. En effet, les lipides polyinsaturés forment une bicouche plus fine que les lipides saturés ou monoinsaturés, ce qui traduit une aire par lipide plus grande (Rawicz *et al.* 2000). L'adhésion bactérienne devrait donc être plus élevée sur le 18:3 PC que sur le POPC, or les niveaux d'adhésion obtenus sont à l'opposés (Figure 70). La même configuration se produit également avec le potentiel d'interaction entre les chaînes carbonées. Par conséquent, l'incorporation des futures données manquantes, notamment sur le 18:3 PC, devra être réalisée sur des corrélations autres que linéaires pour décrire au mieux l'interaction du flagelle.

2. Au-delà de la bicouche lipidique ?

Pr. David Gally et Dr. Eliza Wolfson de l'Université d'Edinburgh, avec qui nous collaborons, ont généré des résultats montrant la pénétration du flagelle, aussi bien d'O157:H7 que de ST, dans la membrane lipidique de cellules épithéliales, ainsi que leur interaction *in vitro* avec des composants du cytosquelette et l'induction de la polymérisation de l'actine (Figure 86).

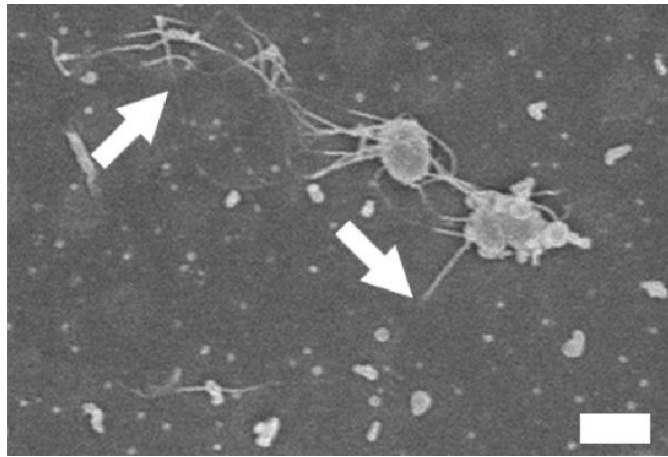


Figure 86 : Disparition de fragments de flagelle de ST sous la membrane, observée par microscopie électronique. Les flèches montrent les points d'entrée et de sortie vers le cœur de la membrane. Echelle 1 μ m. Image appartenant aux collaborateurs écossais de l'Université d'Edinburg (Pr. David Gally et Dr. Eliza Wolfson).

De notre côté, la capacité à déstabiliser la bicouche lipidique, a été étudiée par le suivi de la fuite de la carboxyfluorescéine, la sonde fluorescente ayant été préalablement encapsulée dans des liposomes POPC de 2 μ m. La carboxyfluorescéine possède la caractéristique d'éteindre sa fluorescence (de s'auto-quencher) à forte concentration, ce qui est le cas lorsque celle-ci est encapsulée à haute concentration dans le lumen des liposomes. La sortie de cette molécule en dehors des liposomes se traduit ainsi par une augmentation de la fluorescence dans le milieu de suspension des vésicules, puisque le fluorochrome se retrouve dilué dans le milieu extérieur. Le relargage naturel des liposomes a été systématiquement relevé, en réalisant cette expérience avec des liposomes seuls (sans bactéries). En effet, en fonction de leur nature et de la pression osmotique, les molécules encapsulées diffusent plus ou moins au travers de la membrane de manière passive.

Finalement, la présence seulement d'O157:H7 WT engendre un relargage plus important que le relargage naturel, tandis que O157:H7 Δ motA tendrait plutôt à réduire la diffusion passive. D'après ces résultats le flagelle, en particulier sa motilité, entraîne une déstabilisation de la membrane (Figure 87).

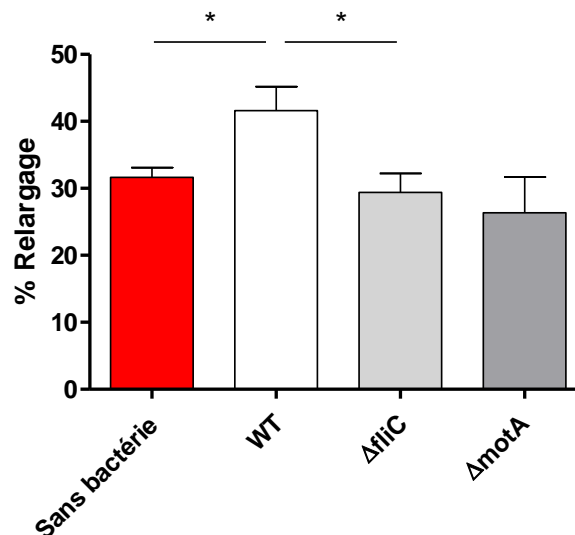


Figure 87: Relargage carboxyfluorescéine à partir de GUVs POPC de 2 μm après 1 h en présence de diverses souches d'O157:H7. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne présentées ci-dessus ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. La significativité est évaluée avec un test *t* de Student et est représentée comme suit : * : $P \leq 0,05$.

Dans l'hypothèse où le flagelle traverse intégralement la membrane, celui-ci doit avoir une affinité suffisamment forte avec l'actine pour promouvoir et stabiliser ce contact. De manière à évaluer la force d'interaction du flagelle avec l'actine, nous avons déterminé la constante de dissociation, K_D , du flagelle pour l'actine et comparé avec celle du flagelle pour les lipides, également calculée ici par Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Cette technique permet de détecter des interactions moléculaires en temps réel entre un ligand immobilisé sur l'or, ici l'actine ou les lipides, et un analyte en solution, ici le flagelle. Néanmoins, la quantité disponible de flagelles n'aurait pas été suffisante pour l'ensemble des tests de liaison et leurs répétitions permettant d'obtenir de manière précise le K_D . Nous avons donc préféré travailler avec de la flagelline pour s'assurer dans un premier temps de l'existence d'une affinité du monomère du flagelle pour l'actine. Ainsi la flagelline H7, obtenue à partir de la dépolymérisation des flagelles précédemment purifiés (Figure 74C), a été utilisée pour déterminer les K_D apparents. Ces derniers correspondent à la concentration d'analytes, conduisant à la moitié de la valeur maximale de liaison avec le ligand. Par conséquent, plus le K_D est petit, plus l'affinité est grande. Au final, ils valent 0,4 et 3,5 μM , respectivement pour la G-actine, actine non polymérisée, et pour la bicouche de PC (Figure 88). La flagelline H7 présente donc plus d'affinité pour la G-actine, que pour les lipides. De façon intéressante, la flagelline possède une affinité pour la bicouche de PC du même ordre de grandeur que l'adhésine FimH, présente sur les pili d'UPEC, pour son récepteur mannose, qui a été déterminée à 2,3 μM (Bouckaert *et al.* 2005).

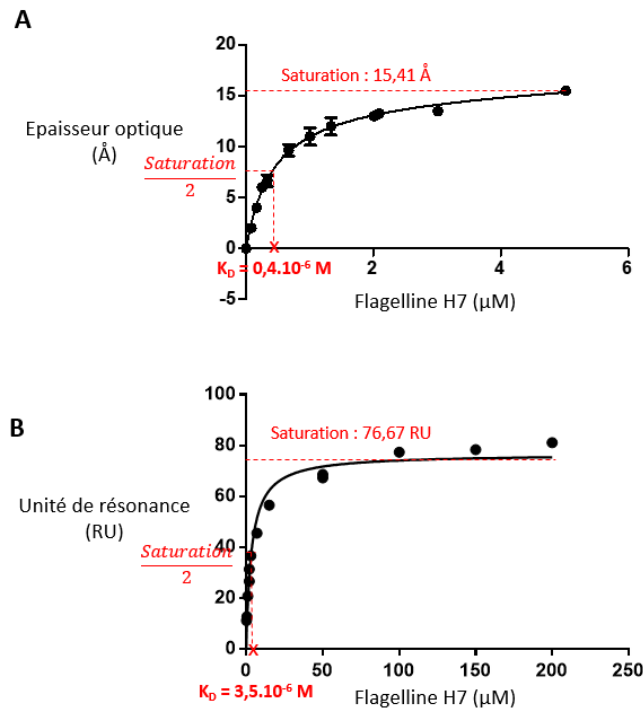


Figure 88 : Détermination de la constante de dissociation entre la flagelline H7 et (A) une bicouche d'egg-PC ou (B) la G-actine. L'épaisseur optique et l'unité de résonance sont proportionnelles à la quantité de flagelline liée. La moyenne et l'écart type ont été calculés à partir de (A) trois ou (B) une expérience(s) indépendante(s).

3. Conclusion et sous discussion

Les propriétés physico-chimiques de la membrane, en l'occurrence son agencement et sa fluidité, ont démontré leur rôle dans la modulation de l'adhésion bactérienne *via* le flagelle. L'écartement lipidique apparaît comme un facteur déterminant. Sur des surfaces abiotiques présentant des microfissures, la largeur des cavités module de manière analogue l'adhésion du flagelle (Friedlander *et al.* 2013). En plus de prendre en compte d'autres lipides tels que le C18:3 PC, la corrélation devra être enrichie avec d'autres caractéristiques physico-chimiques, dont notamment des mesures d'anisotropie à différentes profondeurs dans la membrane. Ces dernières apporteront de meilleurs renseignements sur la fluidité que l'énergie d'interaction des chaînes lipidique, qui donne seulement une indication.

Les pathogènes savent manipuler l'actine par le biais d'effecteurs, qui sont notamment sécrétés par le T3SS de l'injectosome (Anes 2017; Rottner *et al.* 2005). EHEC est capable d'induire la polymérisation de l'actine pour la formation d'un piédestal propice à son adhésion sur la cellule hôte (Battle *et al.* 2014). Aucune adhésine à ce jour n'a été décrite pour interagir avec le cytosquelette. Les premiers résultats présentés ici, tels que la déstabilisation de la membrane,

avancent des arguments en faveur d'une pénétration du flagelle dans la bicouche lipidique. Cependant d'autres expériences, par exemple le Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (FRET), devront être entreprises pour valider cette hypothèse, en démontrant un réel contact entre le flagelle et le cœur hydrophobe de la membrane. Ce nouveau mécanisme d'interaction bactérienne pourrait inclure potentiellement l'actine, avec laquelle la flagelline possède une plus forte affinité que pour les phospholipides (Figures 88 et 89). L'implication dans cette adhésion des domaines D2 et D3 de la flagelline, qui sont les domaines exposés de la flagelline polymérique, sera étudiée prochainement. *A fortiori*, les multiples répétitions de ces domaines augmenteraient possiblement l'avidité du flagelle. Pour étudier leur implication, nous avons tenté des expériences SPR avec des bactéries, qui auraient dans le même temps apporté de précieuses informations sur l'adhésion en fonction du flux, de manière similaire à l'adhésion du pilus de type I d'UPEC (Zagorodko *et al.* 2015). Cependant dans notre cas, les essais n'ont pas été exploitables.

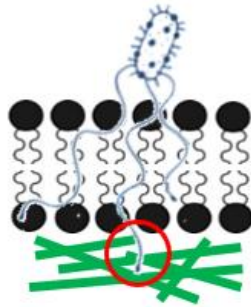


Figure 89 : Possible interaction du flagelle avec l'actine

VI. Annexe des résultats

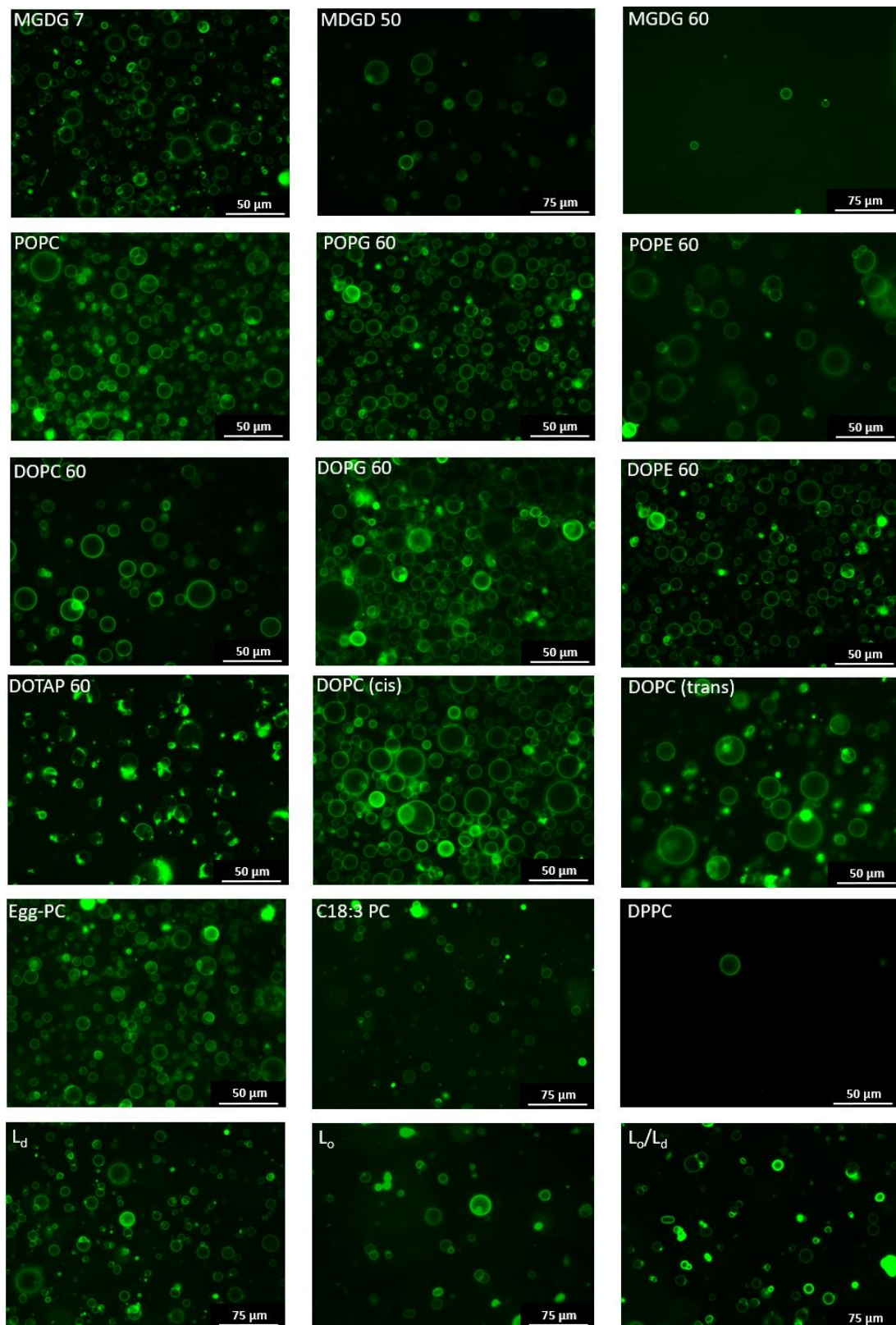


Figure 90 : Vérification de la formation des GUVs pour tous les mélanges lipidiques utilisés. Les mélanges sont précisés en haut à gauche de chaque image. Lorsque le nom du lipide est suivi d'un chiffre, ce dernier indique le pourcentage molaire de celui-ci, le restant étant celui de POPC. Les GUVs contiennent 2% molaire de NBD-PE pour leur visualisation.

Tableau 5 : Proportion lipidique molaire réelle de chaque mélange lipidique. Les proportions molaires ont été déterminées à partir de RMN ¹H, exceptées pour les mélanges L_o, L_d et L_o/L_d, dont la composition a été élucidée par LC-MS. Le chiffre suivant le nom du lipide indique le pourcentage molaire de ce lipide, le restant étant celui de POPC.

X	POPG 60	POPE 60	DOPE 60	DOPC 60	DOPG 60
POPC/X ou POPC/PSM/CHOL	35/65	37/63	43/57	40/60	34/66
DOTAP 60	MGDG 50	MGDG 7	L _o	L _d	L _o /L _d
49/51	49/51	91/9	25/36/39	66/24/10	32/35/32

Tableau 6 : Taux d'immobilisation sur l'or des GUVs pour chaque composition lipidique. Le taux d'immobilisation correspond à la quantité de lipides immobilisée sur la quantité de lipides déposée, les quantités ont été déterminées par GC-FID. Lorsque le nom du lipide est suivi d'un chiffre, ce dernier indique le pourcentage molaire de ce lipide, le restant étant celui du POPC.

Lipid/ Lipid mixture	POPC	POPG 60	POPE 60	DOPE 60	DOPC 60	DOPG 60
Immobilisation rate	9.35%	9.55%	9.95%	8.72%	10.35%	9.83%
Egg-PC	MGDG 50	MGDG 7	DOTAP 60	DOPC (cis)	C18:3 PC	DOPC (trans)
11.06%	11.71%	9.59%	8.09%	9.00%	13.73%	8.94%

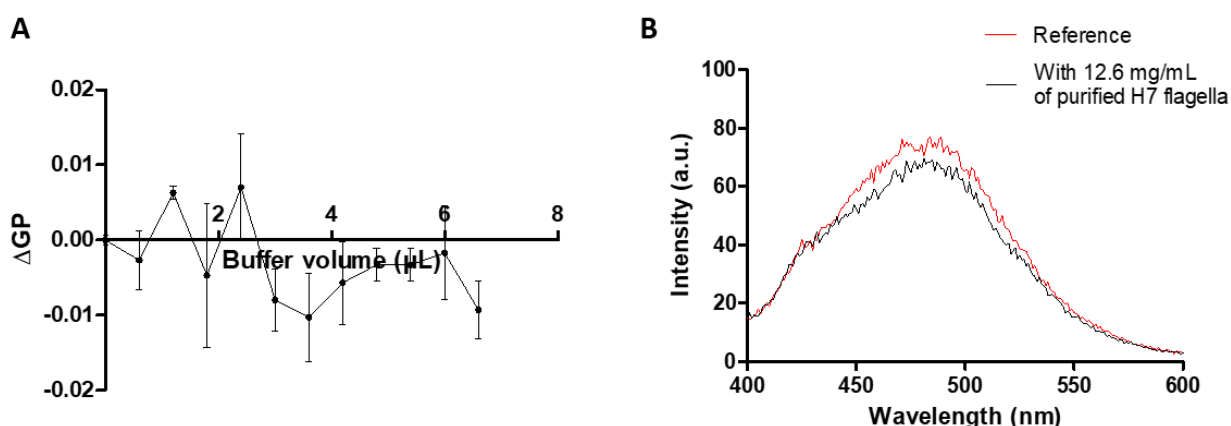


Figure 91 : Contrôle de la stabilité des liposomes et de l'absence de réactivité du Laurdan vis-à-vis du flagelle. (A) Suivi de la stabilité de liposomes de 2 μm sur la durée de l'expérience, le volume de flagelles est remplacé par un volume identique de tampon HEPES. ΔGP correspond à l'ensemble des GPs, auxquelles la GP sans flagelle a été soustraite. (B) Scans superposés de l'émission du Laurdan de 400 à 600 nm en présence ou non de flagelles purifiés H7.

Discussion Générale

Le flagelle est impliqué dans de nombreux processus avantageux pour la bactérie : l'accès à des niches favorables à la croissance bactérienne grâce à la motilité et la chimiotaxie, et l'implication dans des événements précoces d'adhésion conduisant à une colonisation durable grâce au mécanosensing (Berne *et al.* 2018; Rossez *et al.* 2015). Cet organite est très largement partagé chez les bactéries entériques pathogènes, notamment EHEC et ST. L'épithélium intestinal recouvert de mucus, servant de couche protectrice, constitue une double difficulté pour ces bactéries. La première est de survivre dans la couche la plus externe parmi la flore commensale, la deuxième est de franchir la couche adhérente de mucines faisant face à la membrane cellulaire (Wagner *et al.* 2018). Pour traverser cette dernière couche, le flagelle est indispensable à la bactérie, pour autant les mucines et d'autres protéines, telles que la protéine Lyd8, en se liant au flagelle bloque sa motilité et par conséquent sa capacité à atteindre la membrane plasmique, le dernier rempart cellulaire (R. Okumura *et al.* 2016; J. C. Kim *et al.* 2012). Le flagelle est également un atout pour adhérer sur la cellule, cependant son interaction avec la membrane plasmique n'a jamais été étudiée précisément, même si des affinités ou liaisons avec certains lipides ont été identifiées (Rossi *et al.* 2019). Parmi elles, une interaction entre le flagelle et des lipides chargés négativement a été observée sur CCM (Rossez *et al.* 2014).

Dans ce travail, l'interaction du flagelle et plus largement d'une adhésine bactérienne, avec la membrane plasmique a été étudiée pour la première fois sur des modèles biomimétiques mimant la structure lipidique, la taille et la courbure d'une cellule eucaryote. Il existe actuellement très peu de descriptions des mécanismes d'interaction des bactéries avec la membrane plasmique et encore moins des propriétés physico-chimiques qui les gouvernent. Aucun ne concerne une adhésine bactérienne (Pezeshkian *et al.* 2017). Nos résultats ont montré que le flagelle permet une meilleure adhésion sur la bicouche lipidique aussi bien chez O157:H7 que chez ST, et que l'absence de motilité réduit ce gain (Figures 59 et 65).

Par ailleurs, les bactéries ont développé plusieurs stratégies pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de la flagelline. *Pseudomonas aeruginosa* sécrète une protéase alcaline qui dégrade la flagelline monomérique, sans cette enzyme un risque 100 fois plus important d'activer le récepteur TLR5 est présent (Bardoel *et al.* 2011). *Salmonella enterica* possède une stratégie appelée variation de phase, en alternant entre FliC qui permet de mieux coloniser les cellules épithéliales de l'intestin et FljB (Horstmann *et al.* 2017). Cette observation concorde avec nos résultats, puisque l'adhésion de ST exprimant seulement FliC permet une meilleure adhésion sur modèle biomimétique, contrairement à la même souche exprimant FljB

(Figure 65C). De la même façon, certaines flagellines arborent des modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation, afin d'échapper au système immunitaire (Merino et Tomás 2014).

Durant ce travail de thèse, nous avons travaillé sur une autre modification post-traductionnelle de la flagelline, la méthylation. Nous avons identifié que cette modification chez ST permettait une meilleure colonisation de l'épithélium intestinal (Horstmann *et al.* 2019). Ceci tient à l'augmentation de l'hydrophobicité induite par la méthylation, elle-même, qui entraîne une adhésion plus importante sur la bicouche lipidique (Figures 76 et 77A). Ces travaux identifient clairement l'importance de l'hydrophobicité dans l'adhésion du flagelle. Plusieurs études ont confirmé l'implication de l'hydrophobicité du flagelle lors de son attachement sur des surfaces abiotiques (Friedlander *et al.* 2015; Bruzard *et al.* 2015). De façon générale, l'hydrophobicité des surfaces colonisées par les bactéries est un facteur connu de longue date mais assez peu étudié (Rosenberg et Kjelleberg 1986). Ces entérobactéries flagellées, sont capables d'adhérer sur des plantes bien qu'elles ne soient pas leur hôte de prédilection (J. Fletcher *et al.* 2013). Récemment, l'hydrophobicité globale des bactéries a été identifiée comme jouant un rôle dans la rétention bactérienne sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Mittelviehhaus *et al.* 2019). Par conséquent, l'hydrophobicité du flagelle permettrait d'améliorer l'adhésion bactérienne sur différentes surfaces biotiques, comme la membrane plasmique ou les cires végétales.

D'après nos travaux, l'ordre lipidique de la membrane est un facteur contrôlant l'adhésion bactérienne. Que ce soit en faisant varier la nature des chaînes lipidiques ou la courbure de la bicouche, il semble qu'un ordre lipidique optimal existe pour permettre une potentielle insertion du flagelle (Figures 68 et 70). Cependant, la charge des têtes polaires pourrait moduler cette insertion pour un certain ordre lipidique (Figure 68). Par exemple, la polymyxine B, un lipopeptide, qui s'insère dans la membrane bactérienne et la déstabilise, s'insère dans la bicouche *via* la charge de la surface sauf lorsque l'ordre lipidique est trop élevé (Khondker *et al.* 2019).

Le résultat le plus remarquable de ce travail est la capacité à réduire l'adhésion d'O157:H7 chez les cellules cancéreuses humaines du colon HT29, et non celle de son mutant non flagellé, par incorporation d'acide gras linoléique dans les membranes eucaryotes (Figure 72). Ce lipide polyinsaturé, possède une aire par lipide plus grande que les lipides non ou monoinsaturés (Rawicz *et al.* 2000). L'incorporation de lipides polyinsaturés dans la membrane, suite à la

présence d'Omega 3 dans le milieu de culture *in vitro*, entraîne une plus grande fluidité membranaire (Feller *et al.* 2002; K. R. Levental *et al.* 2018; Calder *et al.* 1994). En adéquation avec ces résultats, la diminution de la fluidité membranaire de cellules épithéliales humaines HEp-2 entraîne une inhibition progressive de l'adhésion bactérienne (Ismaili *et al.* 1999). Pourtant, aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à l'existence d'un lien entre l'incorporation d'Omega 3 dans la membrane et la réduction de l'adhésion bactérienne. Dans le présent travail, l'incorporation d'acide linoléique a permis la production de lipides polyinsaturés tels que la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine, qui sont des phospholipides décrits pour être membranaires (Figure 71). Ces résultats supportent donc l'idée que la consommation d'Omega 3 aurait un rôle bénéfique contre l'adhésion d'entérobactéries à l'aide du flagelle.

La fluidité membranaire et l'ordre lipidique sont liés à l'état physique de la membrane et par conséquent à l'adhésion bactérienne (Figure 79). La membrane plasmique est elle-même un patchwork de fluidité, de par la présence putative de domaines ordonnés ou radeaux lipidiques, enrichis en cholestérol et en lipides plutôt saturés, que de domaines désordonnés moins agrégés (Sezgin *et al.* 2017). L'adhésion bactérienne y est donc potentiellement hétérogène, en sachant que ces domaines ordonnés sont décrits dans la littérature pour être potentiellement ciblés par les pathogènes (Lafont et van der Goot 2005). Par exemple, le T3SS chez *Shigella*, dont le translocon IpaB possède une forte affinité pour le cholestérol, ne s'active que lorsqu'il est inséré au sein d'une composition mimant les domaines ordonnés, et ce, même sans récepteur (Goot *et al.* 2004). D'après nos résultats, la présence du flagelle permettrait de doubler le niveau d'adhésion bactérienne sur les domaines ordonnés, par rapport à une bactérie non flagellée (Figure 81). En revanche, l'adhésion des bactéries, qu'elles soient flagellées ou non flagellées, est favorisée sur les domaines désordonnés. De manière intéressante, lorsqu'il y a coexistence de ces deux types de domaine, un effet de synergie apparaît seulement pour les bactéries flagellées. Cette adhésion supplémentaire pourrait être attribuée aux frontières entre les domaines ordonnés et désordonnés, qui se caractérisent par une tension de ligne. Cette dernière est provoquée par une différence d'épaisseur entre les deux domaines, entraînant un coût d'énergie pour ne pas exposer les chaînes hydrophobes dans l'environnement aqueux (Kuzmin *et al.* 2005). Plusieurs protéines ont déjà été décrites pour interagir avec des domaines frontaliers, en particulier l' α -hémolysine (toxine produite par *Staphylococcus aureus*) et le peptide fusion du VIH (Maté *et al.* 2014; Yang *et al.* 2016). La localisation de ce dernier est facilitée par son co-récepteur

CCR5, lui-même situé entre les régions ordonnées et les régions désordonnées *in vitro* (Yang *et al.* 2017).

A l'issue de ce travail, nous avons déterminé un premier mécanisme potentiel d'adhésion du flagelle sur la membrane plasmique, qui ouvre la voie à plusieurs questions :

- quel est l'impact de la charge des lipides lors du premier contact avec la bicouche ?
- quel est le lien entre l'incorporation membranaire de lipides polyinsaturés assimilés par l'alimentation et l'adhésion bactérienne *in vivo* ?
- quels motifs protéiques portés par la flagelline interagissent avec les différents lipides ?
- comment le flagelle, bien que plus volumineux (20 nm de diamètre et jusqu'à 15-20 µm de long) que la membrane plasmique eucaryote (40 Å en moyenne selon le type de lipides) n'induit pas sa destruction complète ? La ré-organisation du flagelle a été suggérée lorsqu'il interagit avec une surface abiotique hydrophobe afin de renforcer l'adhésion. Ceci pourrait être également le cas lors de l'interaction avec la membrane (Friedlander *et al.* 2015).

De futurs travaux permettront d'apporter une compréhension globale de l'ensemble des facteurs impliqués dans l'adhésion. Ils pourront être utilisés afin de prédire l'adhésion bactérienne sur une composition lipidique membranaire donnée. Ces nouvelles connaissances pourront potentiellement conduire au développement de nouveaux traitements visant à inhiber la colonisation bactérienne et à mieux appréhender l'influence du régime alimentaire sur la susceptibilité aux pathologies bactériennes.

Le flagelle bactérien est un objet d'étude surprenant. Récemment encore, un site enzymatique a été découvert et est présent chez 74 espèces bactériennes, dont *Clostridium spp.*, *E. coli* et *Salmonella spp.*, qui pourraient donc potentiellement posséder des activités enzymatiques ou d'autres activités biologiques non identifiées (Eckhard *et al.* 2017). D'après nos premiers résultats et ceux de nos collaborateurs, l'hypothèse que le flagelle serait potentiellement capable de traverser la membrane pour interagir avec l'actine, est proposée (Figures 87 et 88). La mesure de l'adhésion bactérienne sur des GUVs contenant de l'actine, entre autres, permettra dans le futur d'avancer sur cette réflexion (Tsai *et al.* 2011).

Références Bibliographiques

- Abate, Adam R., Tony Hung, Pascaline Mary, Jeremy J. Agresti, et David A. Weitz. 2010. « High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (45): 19163-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006888107>.
- Abby, Sophie S., et Eduardo P. C. Rocha. 2012. « The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems ». *PLOS Genetics* 8 (9): e1002983. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002983>.
- Abkarian, Manouk, Etienne Loiseau, et Gladys Massiera. 2011. « Continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (CDICE) for high throughput monodisperse vesicle design ». *Soft Matter* 7 (10): 4610-14. <https://doi.org/10.1039/C1SM05239J>.
- Aihara, Eitaro, Chet Closson, Andrea L. Matthis, Michael A. Schumacher, Amy C. Engevik, Yana Zavros, Karen M. Ottemann, et Marshall H. Montrose. 2014. « Motility and chemotaxis mediate the preferential colonization of gastric injury sites by *Helicobacter Pylori* ». *PLoS Pathogens* 10 (7): e1004275. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004275>.
- Akashi, K, H Miyata, H Itoh, et K Kinoshita. 1996. « Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. » *Biophysical Journal* 71 (6): 3242-50.
- Akashi, Ken-ichirou, Hidetake Miyata, Hiroyasu Itoh, et Kazuhiko Kinoshita. 1998. « Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion ». *Biophysical Journal* 74 (6): 2973-82. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78004-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78004-X).
- Akiba, T., H. Yoshimura, et K. Namba. 1991. « Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid ». *Science (New York, N.Y.)* 252 (5012): 1544-46.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. 2006. « Pathogen recognition and innate immunity ». *Cell* 124 (4): 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Aldaz, J. M., S. Barza, M. Fujii, et M. S. Moslehian. 2015. « Advances in operator Cauchy--Schwarz inequalities and their reverses ». *Annals of Functional Analysis* 6 (3): 275-95. <https://doi.org/10.15352/afa/06-3-20>.
- Aldridge, Christine, Kritchai Poonchareon, Supreet Saini, Thomas Ewen, Alexandra Soloyva, Christopher V. Rao, Katsumi Imada, Tohru Minamino, et Phillip D. Aldridge. 2010. « The interaction dynamics of a negative feedback loop regulates flagellar number in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ». *Molecular Microbiology* 78 (6): 1416-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07415.x>.
- Aldridge, Phillip D., Joyce E. Karlinsey, Christine Aldridge, Christopher Birchall, Danielle Thompson, Jin Yagasaki, et Kelly T. Hughes. 2006. « The flagellar-specific transcription factor, σ^{28} , is the type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti- σ^{28} factor FlgM ». *Genes & Development* 20 (16): 2315-26. <https://doi.org/10.1101/gad.380406>.
- Aldridge, Phillip D., Cheng Wu, Joshua Gnerer, Joyce E. Karlinsey, Kelly T. Hughes, et Matthew S. Sachs. 2006. « Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (30): 11340-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602127103>.
- Allen, Richard C., Roman Popat, Stephen P. Diggle, et Sam P. Brown. 2014. « Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? » *Nature Reviews Microbiology* 12 (4): 300-308. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3232>.

- Almeida, Rodrigo F. M. de, Luís M. S. Loura, Alexander Fedorov, et Manuel Prieto. 2005. « Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study ». *Journal of Molecular Biology* 346 (4): 1109-20. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.026>.
- Alsharif, Ghadah, Sadia Ahmad, Md Shahidul Islam, Riddhi Shah, Stephen J. Busby, et Anne Marie Krachler. 2015. « Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (17): 5503-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422986112>.
- Ambler, R. P., et M. W. Rees. 1959. « Epsilon-N-methyl-lysine in bacterial flagellar protein ». *Nature* 184 (juillet): 56-57. <https://doi.org/10.1038/184056b0>.
- Andersson, Mats X., Malin H. Stridh, Karin E. Larsson, Conny Liljenberg, et Anna Stina Sandelius. 2003. « Phosphate-deficient oat replaces a major Portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol ». *FEBS Letters* 537 (1-3): 128-32.
- Anes, Elsa. 2017. « Acting on actin during bacterial infection ». *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*, mai. <https://doi.org/10.5772/66861>.
- Angelova, Miglena I., et Dimiter S. Dimitrov. 1986. « Liposome electroformation ». *Faraday Discussions of the Chemical Society* 81 (0): 303-11. <https://doi.org/10.1039/DC9868100303>.
- Arkhipov, Anton, Peter L. Freddolino, Katsumi Imada, Keiichi Namba, et Klaus Schulten. 2006. « Coarse-grained molecular dynamics simulations of a rotating bacterial flagellum ». *Biophysical Journal* 91 (12): 4589-97. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093443>.
- Aronson, M., O. Medalia, L. Schori, D. Mirelman, N. Sharon, et I. Ofek. 1979. « Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside ». *The Journal of Infectious Diseases* 139 (3): 329-32. <https://doi.org/10.1093/infdis/139.3.329>.
- Arora, Shiwani K., Alice N. Neely, Barbara Blair, Stephen Lory, et Reuben Ramphal. 2005. « Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections ». *Infection and Immunity* 73 (7): 4395-98. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4395-4398.2005>.
- Arriaga, Laura R., Sujit S. Datta, Shin-Hyun Kim, Esther Amstad, Thomas E. Kodger, Francisco Monroy, et David A. Weitz. 2014. « Ultrathin shell double emulsion templated giant unilamellar lipid vesicles with controlled microdomain formation ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 10 (5): 950-56. <https://doi.org/10.1002/sml.201301904>.
- Arruda, S., G. Bomfim, R. Knights, T. Huima-Byron, et L. W. Riley. 1993. « Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells ». *Science (New York, N.Y.)* 261 (5127): 1454-57. <https://doi.org/10.1126/science.8367727>.
- Asadi, Arezoo, Shabnam Razavi, Malihe Talebi, et Mehrdad Gholami. 2019. « A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases ». *Infection* 47 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1222-5>.
- Asakura, S. 1970. « Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella ». *Advances in Biophysics* 1: 99-155.
- Athenstaedt, K., et G. Daum. 1999. « Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism ». *European Journal of Biochemistry* 266 (1): 1-16.

- Auvray, F., J. Thomas, G. M. Fraser, et C. Hughes. 2001. « Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone ». *Journal of Molecular Biology* 308 (2): 221-29. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4597>.
- Ayuyan, Artem G., et Fredric S. Cohen. 2006. « Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation ». *Biophysical Journal* 91 (6): 2172-83. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.087387>.
- Bai, Fan, Yusuke V. Morimoto, Shinsuke D. J. Yoshimura, Noritaka Hara, Nobunori Kami-Ike, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2014. « Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus ». *Scientific Reports* 4 (octobre): 6528. <https://doi.org/10.1038/srep06528>.
- Baker, Matthew A. B., Robert M. G. Hynson, Lorraine A. Ganuelas, Nasim Shah Mohammadi, Chu Wai Liew, Anthony A. Rey, Anthony P. Duff, et al. 2016. « Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (3): 197-203. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3172>.
- Bange, Gert, Nico Kümmerer, Christoph Engel, Gunes Bozkurt, Klemens Wild, et Irmgard Sinning. 2010. « FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25): 11295-300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001383107>.
- Bangham, A. D., et R. W. Horne. 1964. « Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope ». *Journal of Molecular Biology* 8 (mai): 660-68. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(64)80115-7).
- Bardoel, Bart W., Sjoerd van der Ent, Michiel J. C. Pel, Jan Tommassen, Corné M. J. Pieterse, Kok P. M. van Kessel, et Jos A. G. van Strijp. 2011. « *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants ». *PLOS Pathogens* 7 (8): e1002206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002206>.
- Barker, Clive S., Irina V. Meshcheryakova, Tomoharu Inoue, et Fadel A. Samatey. 2014. « Assembling flagella in *Salmonella* mutant strains producing a type III export apparatus without FliO ». *Journal of Bacteriology* 196 (23): 4001-11. <https://doi.org/10.1128/JB.02184-14>.
- Barker, Clive S., Irina V. Meshcheryakova, Alla S. Kostyukova, et Fadel A. Samatey. 2010. « FliO regulation of FliP in the formation of the *Salmonella enterica* flagellum ». *PLoS Genetics* 6 (9): e1001143. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001143>.
- Barlag, Britta, et Michael Hensel. 2015. « The giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica* ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (1): 1134-50. <https://doi.org/10.3390/molecules20011134>.
- Battle, Scott E., Michael J. Brady, Sivapriya Kailasan Vanaja, John M. Leong, et Gail A. Hecht. 2014. « Actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* enhances bacterial host cell attachment and concomitant Type III translocation ». *Infection and Immunity* 82 (9): 3713-22. <https://doi.org/10.1128/IAI.01523-13>.
- Beatson, Scott A., Tohru Minamino, et Mark J. Pallen. 2006. « Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure ». *Trends in Microbiology* 14 (4): 151-55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.008>.
- Belas, Robert. 2014. « Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria ». *Trends in Microbiology* 22 (9): 517-27. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002>.

- Benning, Christoph. 2009. « mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 71-91. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113414>.
- Berg, H. C., et D. A. Brown. 1972. « Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional Tracking ». *Nature* 239 (5374): 500-504.
- Berg, Howard C. 2003. « The rotary motor of bacterial flagella ». *Annual Review of Biochemistry* 72: 19-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>.
- Berne, Cecile, Courtney K. Ellison, Adrien Ducret, et Yves V. Brun. 2018. « Bacterial adhesion at the single-cell level ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (10): 616-27. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>.
- Bhoite, Sujeet, Nani van Gerven, Matthew R. Chapman, et Han Remaut. 2019. « Curli biogenesis: bacterial amyloid assembly by the type VIII secretion pathway ». *EcoSal Plus* 8 (2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0037-2018>.
- Bigay, Joëlle, et Bruno Antony. 2012. « Curvature, Lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity ». *Developmental Cell* 23 (5): 886-95. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.009>.
- Billerit, Céline, Gavin D. M. Jeffries, Owe Orwar, et Aldo Jesorka. 2012. « Formation of giant unilamellar vesicles from spin-coated lipid films by localized IR heating ». *Soft Matter* 8 (42): 10823-26. <https://doi.org/10.1039/C2SM26394G>.
- Bingham, Richard J., Enrique Rudiño-Piñera, Nicola A. G. Meenan, Ulrich Schwarz-Linek, Johan P. Turkenburg, Magnus Höök, Elspeth F. Garman, et Jennifer R. Potts. 2008. « Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (34): 12254-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803556105>.
- Birsoy, Kivanç, William T. Festuccia, et Mathieu Laplante. 2013. « A comparative perspective on lipid storage in animals ». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 7): 1541-52. <https://doi.org/10.1242/jcs.104992>.
- Bligh, E. G., et W. J. Dyer. 1959. « A rapid method of total lipid extraction and purification ». *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8): 911-17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Bonifield, Heather R., et Kelly T. Hughes. 2003. « Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism ». *Journal of Bacteriology* 185 (12): 3567-74. <https://doi.org/10.1128/jb.185.12.3567-3574.2003>.
- Bouckaert, Julie, Jenny Berglund, Mark Schembri, Erwin De Genst, Lieve Cools, Manfred Wuhrer, Chia-Suei Hung, et al. 2005. « Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin ». *Molecular Microbiology* 55 (2): 441-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04415.x>.
- Branch, Richard W., Michael N. Sayegh, Chong Shen, Vedavalli S.J. Nathan, et Howard C. Berg. 2014. « Adaptive remodelling by FliN in the bacterial rotary motor ». *Journal of molecular biology* 426 (19): 3314-24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.009>.
- Branton, D. 1966. « Fracture faces of frozen membranes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (5): 1048-56.
- Bratton, D. L., V. A. Fadok, D. A. Richter, J. M. Kailey, L. A. Guthrie, et P. M. Henson. 1997. « Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated

- nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26159-65.
- Braun, T. F., et D. F. Blair. 2001. « Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H⁺ channels in the stator complex ». *Biochemistry* 40 (43): 13051-59.
- Bren, A., et M. Eisenbach. 1998. « The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY ». *Journal of Molecular Biology* 278 (3): 507-14. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1730>.
- Breton, Marie, Mooud Amirkavei, et Lluís M. Mir. 2015. « Optimization of the electroformation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with unsaturated phospholipids ». *The Journal of Membrane Biology* 248 (5): 827-35. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9828-3>.
- Bretscher, M. S. 1972. « Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes ». *Nature: New Biology* 236 (61): 11-12.
- Brian, A A, et H M McConnell. 1984. « Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (19): 6159-63.
- Bruzaud, Jérôme, Jeanne Tarrade, Arnaud Coudreuse, Alexis Canette, Jean-Marie Herry, Elisabeth Taffin de Givenchy, Thierry Darmanin, Frédéric Guittard, Morgan Guilbaud, et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine. 2015a. « Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces ». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 131 (juillet): 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.036>.
- Bulieris, Paula V., Nausad H. Shaikh, Peter L. Freddolino, et Fadel A. Samatey. 2017. « Structure of FlgK reveals the divergence of the bacterial hook-filament junction of *Campylobacter* ». *Scientific Reports* 7 (1): 15743. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15837-0>.
- Cacas, Jean-Luc, Corinne Buré, Kevin Grosjean, Patricia Gerbeau-Pissot, Jeannine Lherminier, Yoann Rombouts, Emmanuel Maes, et al. 2016. « Revisiting plant plasma membrane lipids in *Tobacco*: a focus on sphingolipids ». *Plant Physiology* 170 (1): 367-84. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00564>.
- Calder, P C, P Yaqoob, D J Harvey, A Watts, et E A Newsholme. 1994. « Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. » *Biochemical Journal* 300 (Pt 2): 509-18.
- Campellone, Kenneth G., Douglas Robbins, et John M. Leong. 2004. « EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly ». *Developmental Cell* 7 (2): 217-28. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.004>.
- Castillo, David J., Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, Yong-Suk Che, Nobunori Kami-Ike, Seishi Kudo, Tohru Minamino, et Keiichi Namba. 2013. « The C-terminal periplasmic domain of MotB is responsible for load-dependent control of the number of stators of the bacterial flagellar motor ». *Biophysics (Nagoya-Shi, Japan)* 9: 173-81. <https://doi.org/10.2142/biophysics.9.173>.
- Cegelski, Lynette, Jerome S. Pinkner, Neal D. Hammer, Corinne K. Cusumano, Chia S. Hung, Erik Chorell, Veronica Åberg, et al. 2009. « Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation ». *Nature Chemical Biology* 5 (12): 913-19. <https://doi.org/10.1038/nchembio.242>.

- Chaban, Bonnie, H. Velocity Hughes, et Morgan Beeby. 2015. « The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 46 (octobre): 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>.
- Chambers, Matthew C, Brendan Maclean, Robert Burke, Dario Amodei, Daniel L Ruderman, Steffen Neumann, Laurent Gatto, et al. 2012. « A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics ». *Nature Biotechnology* 30 (10): 918-20. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>.
- Chen, Meiting, Ziyi Zhao, Jin Yang, Kai Peng, Matthew Ab Baker, Fan Bai, et Chien-Jung Lo. 2017. « Length-dependent flagellar growth of *Vibrio alginolyticus* revealed by real time fluorescent imaging ». *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.22140>.
- Chen, X, et H C Berg. 2000. « Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* ». *Biophysical Journal* 78 (2): 1036-41.
- Chevance, Fabienne F. V., et Kelly T. Hughes. 2008. « Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine ». *Nature reviews. Microbiology* 6 (6): 455-65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1887>.
- Chevance, Fabienne F. V., Noriko Takahashi, Joyce E. Karlinsey, Joshua Gnerer, Takanori Hirano, Ram Samudrala, Shin-Ichi Aizawa, et Kelly T. Hughes. 2007. « The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution ». *Genes & Development* 21 (18): 2326-35. <https://doi.org/10.1101/gad.1571607>.
- Chintoan-Uta, C., R. L. Cassady-Cain, et M. P. Stevens. 2016. « Evaluation of flagellum-related proteins FliD and FspA as subunit vaccines against *Campylobacter jejuni* colonisation in chickens ». *Vaccine* 34 (15): 1739-43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.052>.
- Chitale, S., S. Ehrhart, I. Kawamura, T. Fujimura, N. Shimono, N. Anand, S. Lu, L. Cohen-Gould, et L. W. Riley. 2001. « Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry ». *Cellular Microbiology* 3 (4): 247-54.
- Cho, So Yeon, Wan Seok Song, Ho Jeong Hong, Geun-Shik Lee, Seung Goo Kang, Hyun-Jeong Ko, Pyeung-Hyeun Kim, et Sung-Il Yoon. 2017. « Tetrameric structure of the flagellar cap protein FliD from *Serratia marcescens* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 489 (1): 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.093>.
- Chorell, Erik, Jerome S. Pinkner, Christoffer Bengtsson, Sofie Edvinsson, Corinne K. Cusumano, Erik Rosenbaum, Lennart B. Å Johansson, Scott J. Hultgren, et Fredrik Almqvist. 2012. « Design and synthesis of fluorescent pilicides and curlicides: bioactive tools to study bacterial virulence mechanisms ». *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 18 (15): 4522-32. <https://doi.org/10.1002/chem.201103936>.
- Chugh, Priyamvada, et Ewa K. Paluch. 2018. « The actin cortex at a glance ». *J Cell Sci* 131 (14): jcs186254. <https://doi.org/10.1242/jcs.186254>.
- Claret, Laurent, et Colin Hughes. 2000. « Functions of the subunits in the FlhD₂C₂ transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming ». *Journal of Molecular Biology* 303 (4): 467-78. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4149>.
- Cluzel, P., M. Surette, et S. Leibler. 2000. « An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5458): 1652-55.
- Cohen, Eli J., Josie L. Ferreira, Mark S. Ladinsky, Morgan Beeby, et Kelly T. Hughes. 2017. « Nanoscale-length control of the flagellar driveshaft requires hitting the tethered outer membrane ». *Science (New York, N.Y.)* 356 (6334): 197-200. <https://doi.org/10.1126/science.aam6512>.

- Craig, Lisa, Katrina T. Forest, et Berenike Maier. 2019. « Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences ». *Nature Reviews. Microbiology* 17 (7): 429-40. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>.
- Crawford, Robert W., Kristin E. Reeve, et John S. Gunn. 2010. « Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces ». *Journal of Bacteriology* 192 (12): 2981-90. <https://doi.org/10.1128/JB.01620-09>.
- Daleke, David L. 2003. « Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry ». *Journal of Lipid Research* 44 (2): 233-42. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200019-JLR200>.
- Danielli, James Frederic, et Hugh Davson. 1935. « A contribution to the theory of permeability of thin films ». *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5 (4): 495-508. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030050409>.
- Dao, T. P. T., M. Fauquignon, F. Fernandes, E. Ibarboure, A. Vax, M. Prieto, et J. F. Le Meins. 2017. « Membrane properties of giant polymer and lipid vesicles obtained by electroformation and pva gel-assisted hydration methods ». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 533 (novembre): 347-53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.09.005>.
- De Maayer, Pieter, et Don A. Cowan. 2016. « Flashy flagella: flagellin modification is relatively common and highly versatile among the *Enterobacteriaceae* ». *BMC Genomics* 17 (1): 377. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2735-x>.
- Deamer, D. W., et D. Branton. 1967. « Fracture planes in an ice-bilayer model membrane system ». *Science (New York, N.Y.)* 158 (3801): 655-57.
- Deditius, Julia Andrea, Sebastian Felgner, Imke Spöring, Caroline Kühne, Michael Frahm, Manfred Rohde, Siegfried Weiß, et Marc Erhardt. 2015. « Characterization of novel factors involved in swimming and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ». *PLOS ONE* 10 (8): e0135351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135351>.
- DePamphilis, M. L., et J. Adler. 1971. « Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane ». *Journal of Bacteriology* 105 (1): 396-407.
- Deshpande, Siddharth, Yaron Caspi, Anna E. C. Meijering, et Cees Dekker. 2016. « Octanol-assisted liposome assembly on chip ». *Nature Communications* 7 (janvier): 10447. <https://doi.org/10.1038/ncomms10447>.
- Deshpande, Siddharth, et Cees Dekker. 2018. « On-chip microfluidic production of cell-sized liposomes ». *Nature Protocols* 13 (5): 856-74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.160>.
- Destainville, Nicolas, Fabrice Dumas, et Laurence Salomé. 2008. « What do diffusion measurements tell us about membrane compartmentalisation? Emergence of the role of interprotein interactions ». *Journal of Chemical Biology* 1 (1-4): 37-48. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0005-3>.
- Diaz-Rohrer, Blanca B., Kandice R. Levental, Kai Simons, et Ilya Levental. 2014. « Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (23): 8500-8505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404582111>.
- Dick, Robert A., et Volker M. Vogt. 2014. « Membrane interaction of retroviral Gag proteins ». *Frontiers in Microbiology* 5: 187. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00187>.

- Dickey, Allison, et Roland Faller. 2008. « Examining the contributions of lipid shape and headgroup charge on bilayer behavior ». *Biophysical Journal* 95 (6): 2636-46. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.128074>.
- Dickey, Seth W., Gordon Y. C. Cheung, et Michael Otto. 2017. « Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (7): 457-71. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>.
- Dietrich, C., L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, et E. Gratton. 2001. « Lipid rafts reconstituted in model membranes ». *Biophysical Journal* 80 (3): 1417-28. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76114-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76114-0).
- Dimova, Rumiana. 2019. « Giant vesicles and their use in assays for assessing membrane phase state, curvature, mechanics, and electrical properties ». *Annual Review of Biophysics* 48 (mai): 93-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115342>.
- Dodson, Karen W., Jerome S. Pinkner, Thierry Rose, Goran Magnusson, Scott J. Hultgren, et Gabriel Waksman. 2001. « Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor ». *Cell* 105 (6): 733-43. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00388-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00388-9).
- Duncan, Matthew J., Guojie Li, Jeoung-Sook Shin, Johnny L. Carson, et Soman N. Abraham. 2004. « Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (18): 18944-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400769200>.
- Dyer, Collin M., Armand S. Vartanian, Hongjun Zhou, et Frederick W. Dahlquist. 2009. « A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching ». *Journal of Molecular Biology* 388 (1): 71-84. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.004>.
- Eckhard, Ulrich, Hina Bandukwala, Michael J. Mansfield, Giada Marino, JiuJun Cheng, Iain Wallace, Todd Holyoak, et al. 2017. « Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella ». *Nature Communications* 8 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00599-0>.
- Eeman, Marc, et Magali Deleu. 2010. « From biological membranes to biomimetic model membranes ». *BASE*, janvier. <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=6568>.
- Eierhoff, Thorsten, Björn Bastian, Roland Thuenauer, Josef Madl, Aymeric Audfray, Sahaja Aigal, Samuel Juillot, et al. 2014. « A lipid zipper triggers bacterial invasion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (35): 12895-900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402637111>.
- Ekiert, Damian C., Gira Bhabha, Georgia L. Isom, Garrett Greenan, Sergey Ovchinnikov, Ian R. Henderson, Jeffery S. Cox, et Ronald D. Vale. 2017. « Architectures of lipid transport systems for the bacterial outer membrane ». *Cell* 169 (2): 273-285.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.019>.
- Erhardt, Marc, Max E. Mertens, Florian D. Fabiani, et Kelly T. Hughes. 2014. « ATPase-independent type-III protein secretion in *Salmonella enterica* ». *PLoS Genetics* 10 (11): e1004800. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004800>.
- Erhardt, Marc, Keiichi Namba, et Kelly T. Hughes. 2010. « Bacterial nanomachines: The flagellum and type III injectisome ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a000299. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000299>.

- Erhardt, Marc, Hanna M. Singer, Daniel H. Wee, James P. Keener, et Kelly T. Hughes. 2011a. « An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica* ». *The EMBO Journal* 30 (14): 2948-61. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.185>.
- Erhardt, Marc, Paige Wheatley, Eun A. Kim, Takanori Hirano, Yang Zhang, Mayukh K. Sarkar, Kelly T. Hughes, et David F. Blair. 2017. « Mechanism of type-III protein secretion: regulation of FlhA conformation by a functionally critical charged residue cluster ». *Molecular Microbiology* 104 (2): 234-49. <https://doi.org/10.1111/mmi.13623>.
- Evans, Lewis D. B., Simon Poulter, Eugene M. Terentjev, Colin Hughes, et Gillian M. Fraser. 2013. « A chain mechanism for flagellum growth ». *Nature* 504 (7479): 287-90. <https://doi.org/10.1038/nature12682>.
- Fabiani, Florian D., Thibaud T. Renault, Britta Peters, Tobias Dietsche, Eric J. C. Gálvez, Alina Guse, Karen Freier, et al. 2017. « A flagellum-specific chaperone facilitates assembly of the core type III export apparatus of the bacterial flagellum ». *PLoS Biology* 15 (8): e2002267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002267>.
- Fadeel, Bengt, et Ding Xue. 2009. « The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease ». *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44 (5): 264-77. <https://doi.org/10.1080/10409230903193307>.
- Fan, F., et R. M. Macnab. 1996. « Enzymatic characterization of Flil. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella Typhimurium* ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (50): 31981-88.
- Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, et A. Prince. 1998. « Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection ». *Infection and Immunity* 66 (1): 43-51.
- Felix, G., J. D. Duran, S. Volko, et T. Boller. 1999. « Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 18 (3): 265-76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00265.x>.
- Feller, Scott E., Klaus Gawrisch, et Alexander D. MacKerell. 2002. « Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties ». *Journal of the American Chemical Society* 124 (2): 318-26. <https://doi.org/10.1021/ja0118340>.
- Ferris, Hedda U., Yukio Furukawa, Tohru Minamino, Mary B. Kroetz, May Kihara, Keiichi Namba, et Robert M. Macnab. 2005. « FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (50): 41236-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509438200>.
- Fletcher, Daniel A., et R. Dyche Mullins. 2010. « Cell mechanics and the cytoskeleton ». *Nature* 463 (7280): 485-92. <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
- Fletcher, Jacqueline, Jan E. Leach, Kellye Eversole, et Robert Tauxe. 2013. « Human pathogens on plants: designing a multidisciplinary strategy for research ». *Phytopathology* 103 (4): 306-15. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0236-IA>.
- Foster, T. J. 2016. « The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 35 (12): 1923-31. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2763-0>.

- Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, et R. M. Macnab. 1992. « Localization of the *Salmonella* Typhimurium flagellar switch protein FlIG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14): 6304-8.
- Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, et D. J. DeRosier. 1994. « Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex ». *Journal of Molecular Biology* 235 (4): 1261-70. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1079>.
- Fraser, G. M., J. C. Bennett, et C. Hughes. 1999. « Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly ». *Molecular Microbiology* 32 (3): 569-80.
- Fraser, Gillian M., Takanori Hirano, Hedda U. Ferris, Lara L. Devgan, May Kihara, et Robert M. Macnab. 2003. « Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB ». *Molecular Microbiology* 48 (4): 1043-57.
- Fratamico, Pina M., Chitrita DebRoy, Yanhong Liu, David S. Needleman, Gian Marco Baranzoni, et Peter Feng. 2016. « Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli* ». *Frontiers in Microbiology* 7 (mai). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>.
- Freire, João M., Marco M. Domingues, Joana Matos, Manuel N. Melo, Ana Salomé Veiga, Nuno C. Santos, et Miguel A. R. B. Castanho. 2011. « Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes ». *European Biophysics Journal* 40 (4): 481-87. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0661-4>.
- Friedlander, Ronn S., Hera Vlamakis, Philseok Kim, Mughees Khan, Roberto Kolter, et Joanna Aizenberg. 2013. « Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (14): 5624-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219662110>.
- Friedlander, Ronn S., Nicolas Vogel, et Joanna Aizenberg. 2015. « Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 31 (22): 6137-44. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00815>.
- Frolov, Vadim A., Anna V. Shnyrova, et Joshua Zimmerberg. 2011. « Lipid polymorphisms and membrane shape ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004747>.
- Frye, Jonathan, Joyce E. Karlinsey, Heather R. Felise, Bruz Marzolf, Naeem Dowidar, Michael McClelland, et Kelly T. Hughes. 2006. « Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2233-43. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2233-2243.2006>.
- Frye, L. D., et M. Edidin. 1970. « The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons ». *Journal of Cell Science* 7 (2): 319-35.
- Fujii, Takashi, Takayuki Kato, Koichi D. Hiraoka, Tomoko Miyata, Tohru Minamino, Fabienne F. V. Chevance, Kelly T. Hughes, et Keiichi Namba. 2017. « Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook ». *Nature Communications* 8: 14276. <https://doi.org/10.1038/ncomms14276>.
- Fujii, Takashi, Takayuki Kato, et Keiichi Namba. 2009. « Specific arrangement of alpha-helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function ». *Structure (London, England: 1993)* 17 (11): 1485-93. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.017>.

- Fujii, Takashi, Hideyuki Matsunami, Yumi Inoue, et Keiichi Namba. 2018. « Evidence for the hook supercoiling mechanism of the bacterial flagellum ». *Biophysics and Physicobiology* 15 (février): 28-32. https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_28.
- Fujimoto, Toyoshi, et Ingela Parmryd. 2017. « Interleaflet coupling, pinning, and leaflet asymmetry—major players in plasma membrane nanodomain formation ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00155>.
- Fukumura, Takuma, Fumiaki Makino, Tobias Dietsche, Miki Kinoshita, Takayuki Kato, Samuel Wagner, Keiichi Namba, Katsumi Imada, et Tohru Minamino. 2017. « Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex ». *PLoS Biology* 15 (8): e2002281. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002281>.
- Fukushima, H., T. Hashizume, Y. Morita, J. Tanaka, K. Azuma, Y. Mizumoto, M. Kaneno, M. Matsuura, K. Konma, et T. Kitani. 1999. « Clinical experiences in sakai city hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai city, 1996 ». *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society* 41 (2): 213-17.
- Funakoshi, Kei, Hiroaki Suzuki, et Shoji Takeuchi. 2007. « Formation of giant lipid vesicle like compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow ». *Journal of the American Chemical Society* 129 (42): 12608-9. <https://doi.org/10.1021/ja074029f>.
- Furt, Fabienne, Françoise Simon-Plas, et Sébastien Mongrand. 2011. « Lipids of the plant plasma membrane ». In *The Plant Plasma Membrane*, édité par Angus S. Murphy, Burkhard Schulz, et Wendy Peer, 3-30. Plant Cell Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_1.
- Galeva, Anna, Natalia Moroz, Young-Ho Yoon, Kelly T. Hughes, Fadel A. Samatey, et Alla S. Kostyukova. 2014. « Bacterial flagellin-specific chaperone FliS interacts with anti-sigma factor FlgM ». *Journal of Bacteriology* 196 (6): 1215-21. <https://doi.org/10.1128/JB.01278-13>.
- Garten, Matthias, Sophie Aimon, Patricia Bassereau, et Gilman E. S. Toombes. 2015. « Reconstitution of a transmembrane protein, the voltage-gated ion channel, KvAP, into giant unilamellar vesicles for microscopy and patch clamp studies ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 95 (janvier): 52281. <https://doi.org/10.3791/52281>.
- Gibiansky, Maxim L., Jacinta C. Conrad, Fan Jin, Vernita D. Gordon, Dominick A. Motto, Margie A. Mathewson, Wiktor G. Stopka, Daria C. Zelasko, Joshua D. Shrout, et Gerard C. L. Wong. 2010. « Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6001): 197. <https://doi.org/10.1126/science.1194238>.
- Giepmans, Ben N. G., et Sven C. D. van Ijzendoorn. 2009. « Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (4): 820-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.07.015>.
- Girard, Philippe, Jacques Pécréaux, Guillaume Lenoir, Pierre Falson, Jean-Louis Rigaud, et Patricia Bassereau. 2004. « A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles ». *Biophysical Journal* 87 (1): 419-29. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040360>.
- González-Pedrajo, Bertha, Gillian M. Fraser, Tohru Minamino, et Robert M. Macnab. 2002. « Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway ». *Molecular Microbiology* 45 (4): 967-82.
- González-Pedrajo, Bertha, Tohru Minamino, May Kihara, et Keiichi Namba. 2006. « Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for

- facilitating type III protein export ». *Molecular Microbiology* 60 (4): 984-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05149.x>.
- Goot, Françoise G. van der, Guy Tran van Nhieu, Abdelmounaïm Allaoui, Phillipe Sansonetti, et Frank Lafont. 2004. « Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (46): 47792-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406824200>.
- Gorter, E., et F. Grendel. 1925. « On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood ». *The Journal of Experimental Medicine* 41 (4): 439-43.
- Grad, Yonatan H., Marc Lipsitch, Michael Feldgarden, Harindra M. Arachchi, Gustavo C. Cerqueira, Michael Fitzgerald, Paul Godfrey, et al. 2012. « Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8): 3065-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121491109>.
- Greene, Sarah E., Jerome S. Pinkner, Erik Chorell, Karen W. Dodson, Carrie L. Shaffer, Matt S. Conover, Jonathan Livny, Maria Hadjifrangiskou, Fredrik Almqvist, et Scott J. Hultgren. 2014. « Pilicide Ec240 disrupts virulence circuits in uropathogenic *Escherichia coli* ». *MBio* 5 (6): e02038-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02038-14>.
- Gronnier, Julien, Patricia Gerbeau-Pissot, Véronique Germain, Sébastien Mongrand, et Françoise Simon-Plas. 2018. « Divide and rule: plant plasma membrane organization ». *Trends in Plant Science* 23 (10): 899-917. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.007>.
- Grösch, Sabine, Susanne Schiffmann, et Gerd Geisslinger. 2012. « Chain length-specific properties of ceramides ». *Progress in Lipid Research* 51 (1): 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>.
- Grosjean, Kevin, Sébastien Mongrand, Laurent Beney, Françoise Simon-Plas, et Patricia Gerbeau-Pissot. 2015. « Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (9): 5810-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598805>.
- Gutierrez, M. Gertrude, et Noah Malmstadt. 2014. « Human serotonin receptor 5-HT1A preferentially segregates to the liquid disordered phase in synthetic lipid bilayers ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (39): 13530-33. <https://doi.org/10.1021/ja507221m>.
- Habermann, Nina, Bernd Christian, Bernd Luckas, Beatrice L. Pool-Zobel, Elizabeth K. Lund, et Michael Glei. 2009. « Effects of fatty acids on metabolism and cell growth of human colon cell lines of different transformation state ». *BioFactors (Oxford, England)* 35 (5): 460-67. <https://doi.org/10.1002/biof.60>.
- Häkkinen, Hannu. 2012. « The gold-sulfur interface at the nanoscale ». *Nature Chemistry* 4 (6): 443-55. <https://doi.org/10.1038/nchem.1352>.
- Ham, Hyeilin, Anju Sreelatha, et Kim Orth. 2011. « Manipulation of host membranes by bacterial effectors ». *Nature Reviews. Microbiology* 9 (9): 635-46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2602>.
- Hamilton, James A. 2003. « Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins ». *Current Opinion in Lipidology* 14 (3): 263-71. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000073507.41685.9b>.
- Hankins, Hannah M., Ryan D. Baldridge, Peng Xu, et Todd R. Graham. 2015. « Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (1): 35-47. <https://doi.org/10.1111/tra.12233>.

- Hansen, Jesper S., James R. Thompson, Claus Hélix-Nielsen, et Noah Malmstadt. 2013. « Lipid directed intrinsic membrane protein segregation ». *Journal of the American Chemical Society* 135 (46): 17294-97. <https://doi.org/10.1021/ja409708e>.
- Hanuszkiewicz, Anna, Paula Pittock, Fiachra Humphries, Hermann Moll, Amanda Roa Rosales, Antonio Molinaro, Paul N. Moynagh, Gilles A. Lajoie, et Miguel A. Valvano. 2014. « Identification of the flagellin glycosylation system in *Burkholderia cenocepacia* and the contribution of glycosylated flagellin to evasion of human innate immune responses ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (27): 19231-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.562603>.
- Hara, Noritaka, Yusuke V. Morimoto, Akihiro Kawamoto, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2012. « Interaction of the extreme N-terminal region of FliH with FlhA is required for efficient bacterial flagellar protein export ». *Journal of Bacteriology* 194 (19): 5353-60. <https://doi.org/10.1128/JB.01028-12>.
- Harapanahalli, Akshay K., Yun Chen, Jiuyi Li, Henk J. Busscher, et Henny C. van der Mei. 2015. « Influence of adhesion force on *IcaA* and *CidA* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (10): 3369-78. <https://doi.org/10.1128/AEM.04178-14>.
- Harayama, Takeshi, et Howard Riezman. 2018. « Understanding the diversity of membrane lipid composition ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (5): 281-96. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- Haskard, Carolyn A., et Eunice C. Y. Li-Chan. 1998. « Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (7): 2671-77. <https://doi.org/10.1021/jf970876y>.
- Hayakawa, Jumpei, Morio Ishizuka. 2012. « Flagellar Glycosylation: Current Advances, Glycosylation ». *Glycosylation*, septembre. <https://doi.org/10.5772/48352>.
- Heberle, Frederick A., Jing Wu, Shih Lin Goh, Robin S. Petruzielo, et Gerald W. Feigenson. 2010. « Comparison of three ternary lipid bilayer mixtures: FRET and ESR reveal nanodomains ». *Biophysical Journal* 99 (10): 3309-18. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.064>.
- Heiniger, Ryan W., Hanne C. Winther-Larsen, Raymond J. Pickles, Michael Koomey, et Matthew C. Wolfgang. 2010. « Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin ». *Cellular Microbiology* 12 (8): 1158-73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01461.x>.
- Henn, F. A., Glen L. Decker, J. W. Greenawalt, et T. E. Thompson. 1967. « Properties of lipid bilayer membranes separating two aqueous phases: Electron microscope studies ». *Journal of Molecular Biology* 24 (1): 51-58. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90089-7).
- Hirai, Hiroyuki, Ryota Takai, Megumi Iwano, Masaru Nakai, Machiko Kondo, Seiji Takayama, Akira Isogai, et Fang-Sik Che. 2011. « Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (29): 25519-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254029>.
- Hirano, T., T. Minamino, et R. M. Macnab. 2001. « The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a Flagellum-Specific Muramidase ». *Journal of Molecular Biology* 312 (2): 359-69. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4963>.

- Hirano, T., S. Yamaguchi, K. Oosawa, et S. Aizawa. 1994. « Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 176 (17): 5439-49.
- Hirano, Takanori, Shino Mizuno, Shin-Ichi Aizawa, et Kelly T. Hughes. 2009. « Mutations in *flk*, *flgG*, *flhA*, and *flhE* that affect the flagellar type III secretion specificity switch in *Salmonella enterica* ». *Journal of Bacteriology* 191 (12): 3938-49. <https://doi.org/10.1128/JB.01811-08>.
- Hiraoka, Koichi D., Yusuke V. Morimoto, Yumi Inoue, Takashi Fujii, Tomoko Miyata, Fumiaki Makino, Tohru Minamino, et Keiichi Namba. 2017. « Straight and rigid flagellar hook made by insertion of the FlgG specific sequence into FlgE ». *Scientific Reports* 7 (avril): 46723. <https://doi.org/10.1038/srep46723>.
- Hishida, M., H. Seto, N. L. Yamada, et K. Yoshikawa. 2008. « Hydration process of multi-stacked phospholipid bilayers to form giant vesicles ». *Chemical Physics Letters* 455 (4): 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.02.065>.
- Hishida, Mafumi, Hideki Seto, et Kenichi Yoshikawa. 2005. « Smooth/rough layering in liquid-crystalline/gel state of dry phospholipid film, in relation to its ability to generate giant vesicles ». *Chemical Physics Letters* 411 (1): 267-72. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.06.045>.
- Homma, M., D. J. DeRosier, et R. M. Macnab. 1990. « Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella Typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum ». *Journal of Molecular Biology* 213 (4): 819-32. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80266-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80266-9).
- Homma, M., et T. Iino. 1985. « Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 162 (1): 183-89.
- Homma, M., K. Kutsukake, T. Iino, et S. Yamaguchi. 1984. « Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 157 (1): 100-108.
- Hong, Ho Jeong, Tae Hee Kim, Wan Seok Song, Hyun-Jeong Ko, Geun-Shik Lee, Seung Goo Kang, Pyeung-Hyeun Kim, et Sung-Il Yoon. 2018. « Crystal structure of FlgL and its implications for flagellar assembly ». *Scientific Reports* 8 (1): 14307. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32460-9>.
- Horger, Kim S., Daniel J. Estes, Ricardo Capone, et Michael Mayer. 2009. « Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength ». *Journal of the American Chemical Society* 131 (5): 1810-19. <https://doi.org/10.1021/ja805625u>.
- Horger, Kim S., Haiyan Liu, Divya K. Rao, Suneet Shukla, David Sept, Suresh V. Ambudkar, et Michael Mayer. 2015. « Hydrogel-assisted functional reconstitution of human P-glycoprotein (ABCB1) in giant liposomes ». *Biochimica et biophysica acta* 1848 (2): 643-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.023>.
- Horstmann, Julia A., Michele Lunelli, Hélène Cazzola, Johannes Heidemann, Caroline Kühne, Pascal Steffen, Sandra Szefs, et al. 2019. « Flagella methylation promotes bacterial adhesion and host cell invasion ». *BioRxiv*, septembre, 774588. <https://doi.org/10.1101/774588>.
- Horstmann, Julia A., Erik Zschieschang, Theresa Truschel, Juana de Diego, Michele Lunelli, Manfred Rohde, Tobias May, et al. 2017. « Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation ». *Cellular Microbiology* 19 (8). <https://doi.org/10.1111/cmi.12739>.

- Hospenthal, Manuela K., Tiago R. D. Costa, et Gabriel Waksman. 2017. « A comprehensive guide to pilus biogenesis in gram-negative bacteria ». *Nature Reviews. Microbiology* 15 (6): 365-79. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.40>.
- Hosu, Basarab G., et Howard C. Berg. 2018. « CW and CCW conformations of the *E. coli* flagellar motor C-Ring evaluated by fluorescence anisotropy ». *Biophysical Journal* 114 (3): 641-49. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.001>.
- Howell, Amy B. 2007. « Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections ». *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (6): 732-37. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700038>.
- Huber, A. H., W. J. Nelson, et W. I. Weis. 1997. « Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin ». *Cell* 90 (5): 871-82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80352-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80352-9).
- Hug, Isabelle, Siddharth Deshpande, Kathrin S. Sprecher, Thomas Pfohl, et Urs Jenal. 2017. « Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor ». *Science (New York, N.Y.)* 358 (6362): 531-34. <https://doi.org/10.1126/science.aan5353>.
- Hughes, Kelly T. 2017. « Flagellum length control: how long is long enough? » *Current Biology: CB* 27 (11): R413-15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.008>.
- Husson, Marie-Odile, Delphine Ley, Céline Portal, Madeleine Gottrand, Thomas Hueso, Jean-Luc Desseyn, et Frédéric Gottrand. 2016. « Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids ». *Journal of Infection* 73 (6): 523-35. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.10.001>.
- Hutchins, Paul D., Jason D. Russell, et Joshua J. Coon. 2018. « LipiDex: an integrated software package for high-confidence lipid identification ». *Cell Systems* 6 (5): 621-625.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.011>.
- Hutchison, Jaime B., Robert M. Weis, et Anthony D. Dinsmore. 2012. « Change of line tension in phase-separated vesicles upon protein binding ». *Langmuir* 28 (11): 5176-81. <https://doi.org/10.1021/la204225a>.
- Hymes, Jeffrey P., et Todd R. Klaenhammer. 2016. « Stuck in the middle: fibronectin-binding proteins in gram-positive bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 7: 1504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01504>.
- Ibarguren, Maitane, David J. López, et Pablo V. Escribá. 2014. « The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology, Pathology and Therapy*, 1838 (6): 1518-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.021>.
- Ibuki, Tatsuya, Katsumi Imada, Tohru Minamino, Takayuki Kato, Tomoko Miyata, et Keiichi Namba. 2011. « Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (3): 277-82. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1977>.
- Iino, T. 1974. « Assembly of *Salmonella* flagellin *in vitro* and *in vivo* ». *Journal of Supramolecular Structure* 2 (2-4): 372-84. <https://doi.org/10.1002/jss.400020226>.
- Ikeda, T., S. Yamaguchi, et H. Hotani. 1993. « Flagellar growth in a filament-less *Salmonella* *fliD* mutant supplemented with purified hook-associated protein 2 ». *Journal of Biochemistry* 114 (1): 39-44.

- Imada, Katsumi. 2017. « Bacterial flagellar axial structure and its construction ». *Biophysical Reviews* 10 (2): 559-70. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0378-z>.
- Imada, Katsumi, Tohru Minamino, Miki Kinoshita, Yukio Furukawa, et Keiichi Namba. 2010. « Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8812-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001866107>.
- Ipsen, J. H., G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, et M. J. Zuckermann. 1987. « Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 905 (1): 162-72.
- Ismaili, A., J. B. Meddings, S. Ratnam, et P. M. Sherman. 1999. « Modulation of host cell membrane fluidity: a novel mechanism for preventing bacterial adhesion ». *The American Journal of Physiology* 277 (1): G201-208. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.1.G201>.
- Isom, Georgia L., Nathaniel J. Davies, Zhi-Soon Chong, Jack A. Bryant, Mohammed Jamshad, Maria Sharif, Adam F. Cunningham, et al. 2017. « MCE domain proteins: conserved inner membrane lipid-binding proteins required for outer membrane homeostasis ». *Scientific Reports* 7 (1): 8608. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09111-6>.
- Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, et Barry W. Ninham. 1976. « Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers ». *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72 (0): 1525-68. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- Janiak, M. J., D. M. Small, et G. G. Shipley. 1979. « Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin ». *The Journal of Biological Chemistry* 254 (13): 6068-78.
- Jensen Morten Ø, et Ole G. Mouritsen. 2004. « Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1666 (1-2): 205-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.009>.
- Jones, C. J., M. Homma, et R. M. Macnab. 1987. « Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 169 (4): 1489-92.
- Jones, C. J., R. M. Macnab, H. Okino, et S. Aizawa. 1990. « Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Molecular Biology* 212 (2): 377-87.
- Jorgensen, Ine, et Patrick C. Seed. 2012. « How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli* ». *PLOS Pathogens* 8 (10): e1002907. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002907>.
- Joseph, Sonja, et Heike Bunjes. 2012. « Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (7): 2479-89. <https://doi.org/10.1002/jps.23163>.
- Jouhet, Juliette. 2013. « Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization ». *Frontiers in Plant Science* 4 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00494>.
- Journet, Laure, Céline Agrain, Petr Broz, et Guy R. Cornelis. 2003. « The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1757-60. <https://doi.org/10.1126/science.1091422>.

- Kaasgaard, Thomas, Chad Leidy, John H. Crowe, Ole G. Mouritsen, et Kent Jørgensen. 2003. « Temperature-controlled structure and kinetics of ripple phases in one- and two-component supported lipid bilayers ». *Biophysical Journal* 85 (1): 350-60. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74479-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74479-8).
- Kaiser, Hermann-Josef, Adam Orłowski, Tomasz Róg, Thomas K. M. Nyholm, Wengang Chai, Ten Feizi, Daniel Lingwood, Ilpo Vattulainen, et Kai Simons. 2011. « Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40): 16628-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103742108>.
- Kalir, S., J. McClure, K. Pabbaraju, C. Southward, M. Ronen, S. Leibler, M. G. Surette, et U. Alon. 2001. « Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 292 (5524): 2080-83. <https://doi.org/10.1126/science.1058758>.
- Källenius, G., S. Svenson, R. Möllby, B. Cedergren, H. Hultberg, et J. Winberg. 1981. « Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli* ». *Lancet (London, England)* 2 (8247): 604-6. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92743-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92743-4).
- Kamiya, Koki, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Kazunari Akiyoshi, et Shoji Takeuchi. 2016. « Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes ». *Nature Chemistry* 8 (9): 881-89. <https://doi.org/10.1038/nchem.2537>.
- Kang'ethe, Wanyoike, et Harris D. Bernstein. 2013. « Charge-dependent secretion of an intrinsically disordered protein via the autotransporter pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (45): E4246-4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310345110>.
- Karberg, Katherine A., Gary J. Olsen, et James J. Davis. 2011. « Similarity of genes horizontally acquired by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* is evidence of a supraspecies pangenome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (50): 20154-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109451108>.
- Karlinsey, J. E., J. Lonner, K. L. Brown, et K. T. Hughes. 2000. « Translation/secretion coupling by type III secretion systems ». *Cell* 102 (4): 487-97.
- Karlinsey, J. E., S. Tanaka, V. Bettenworth, S. Yamaguchi, W. Boos, S. I. Aizawa, et K. T. Hughes. 2000. « Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella* Typhimurium flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription ». *Molecular Microbiology* 37 (5): 1220-31.
- Kato, A., et S. Nakai. 1980. « Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 624 (1): 13-20. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90220-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90220-2).
- Khanra, Nandish, Paolo Rossi, Anastassios Economou, et Charalampos G. Kalodimos. 2016. « Recognition and targeting mechanisms by chaperones in flagellum assembly and operation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (35): 9798-9803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607845113>.
- Khare, Baldeep, et Sthanam V. L. Narayana. 2017. « Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: roles of sortases and implications for assembly ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 26 (8): 1458-73. <https://doi.org/10.1002/pro.3191>.
- Khondker, Adree, Alexander K. Dhaliwal, Sokunthearath Saem, Ahmad Mahmood, Cécile Fradin, Jose Moran-Mirabal, et Maikel C. Rheinstädter. 2019. « Membrane charge and lipid packing

- determine polymyxin-induced membrane damage ». *Communications Biology* 2: 67. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0297-6>.
- Kihara, M., G. U. Miller, et R. M. Macnab. 2000. « Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of *Salmonella* ». *Journal of Bacteriology* 182 (11): 3022-28.
- Kim, Eun A., Joseph Panushka, Trevor Meyer, Ryan Carlisle, Samantha Baker, Nicholas Ide, Michael Lynch, Brian R. Crane, et David F. Blair. 2017. « Architecture of the flagellar switch complex of *Escherichia coli*: conformational plasticity of FliG and implications for adaptive remodeling ». *Journal of Molecular Biology* 429 (9): 1305-20. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.014>.
- Kim, Eun A., Joseph Panushka, Trevor Meyer, Nicholas Ide, Ryan Carlisle, Samantha Baker, et David F. Blair. 2017. « Biogenesis of the flagellar switch complex in *Escherichia coli*: formation of sub-complexes independently of the basal-body MS-ring ». *Journal of Molecular Biology* 429 (15): 2353-59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.006>.
- Kim, Jong Chul, Jang W. Yoon, Cheorl-Ho Kim, Mi-Sun Park, et Seung-Hak Cho. 2012. « Repression of flagella motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by mucin components ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (4): 789-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.041>.
- Kind, Tobias, Kwang-Hyeon Liu, Do Yup Lee, Brian DeFelice, John K Meissen, et Oliver Fiehn. 2013. « LipidBlast *in silico* tandem mass spectrometry database for lipid identification. » *Nature Methods* 10 (8): 755-58. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2551>.LipidBlast.
- Kinoshita, Miki, Shin-Ichi Aizawa, Yumi Inoue, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2017. « The role of intrinsically disordered C-terminal region of FliK in substrate specificity switching of the bacterial flagellar type III export apparatus ». *Molecular Microbiology* 105 (4): 572-88. <https://doi.org/10.1111/mmi.13718>.
- Kinoshita, Miki, Noritaka Hara, Katsumi Imada, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2013. « Interactions of bacterial flagellar chaperone-substrate complexes with FlhA contribute to co-ordinating assembly of the flagellar filament ». *Molecular Microbiology* 90 (6): 1249-61. <https://doi.org/10.1111/mmi.12430>.
- Kinoshita, Miki, Yuki Nakanishi, Yukio Furukawa, Keiichi Namba, Katsumi Imada, et Tohru Minamino. 2016. « Rearrangements of α -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export ». *Molecular Microbiology* 101 (4): 656-70. <https://doi.org/10.1111/mmi.13415>.
- Kinoshita, Miki, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2018. « Effect of a clockwise-locked deletion in FliG on the FliG ring structure of the bacterial flagellar motor ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 23 (3): 241-47. <https://doi.org/10.1111/gtc.12565>.
- Kline, Kimberly A., Stefan Fälker, Sofia Dahlberg, Staffan Normark, et Birgitta Henriques-Normark. 2009. « Bacterial adhesins in host-microbe interactions ». *Cell Host & Microbe* 5 (6): 580-92. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>.
- Knoll, W. 1998. « Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves ». *Annual Review of Physical Chemistry* 49: 569-638. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.49.1.569>.
- Kodera, Noriyuki, Kaoru Uchida, Toshio Ando, et Shin-Ichi Aizawa. 2015. « Two-ball structure of the flagellar hook-length control protein FliK as revealed by high-speed atomic force microscopy ». *Journal of Molecular Biology* 427 (2): 406-14. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.007>.

- Koelmel, Jeremy P., Nicholas M. Kroeger, Candice Z. Ulmer, John A. Bowden, Rainey E. Patterson, Jason A. Cochran, Christopher W.W. Beecher, Timothy J. Garrett, et Richard A. Yost. 2017. « LipidMatch: an automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data ». *BMC Bioinformatics* 18 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1744-3>.
- Kojima, Seiji, et David F. Blair. 2004. « Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli* ». *Biochemistry* 43 (1): 26-34. <https://doi.org/10.1021/bi035405l>.
- Kojima, Seiji, Yukio Furukawa, Hideyuki Matsunami, Tohru Minamino, et Keiichi Namba. 2008. « Characterization of the periplasmic domain of MotB and implications for its role in the stator assembly of the bacterial flagellar motor ». *Journal of Bacteriology* 190 (9): 3314-22. <https://doi.org/10.1128/JB.01710-07>.
- Kojima, Seiji, Katsumi Imada, Mayuko Sakuma, Yuki Sudo, Chojiro Kojima, Tohru Minamino, Michio Homma, et Keiichi Namba. 2009. « Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB ». *Molecular Microbiology* 73 (4): 710-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06802.x>.
- Kojima, Seiji, Masato Takao, Gaby Almira, Ikumi Kawahara, Mayuko Sakuma, Michio Homma, Chojiro Kojima, et Katsumi Imada. 2018. « The helix rearrangement in the periplasmic domain of the flagellar stator B subunit activates peptidoglycan binding and ion influx ». *Structure (London, England: 1993)* 26 (4): 590-598.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.02.016>.
- Krachler, Anne Marie, Hyeilin Ham, et Kim Orth. 2011. « Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (28): 11614-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102360108>.
- Krachler, Anne Marie, et Kim Orth. 2011. « Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin Multivalent Adhesion Molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (45): 38939-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291377>.
- . 2013. « Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy ». *Virulence* 4 (4): 284-94. <https://doi.org/10.4161/viru.24606>.
- Krammer, Eva-Maria, Jerome de Ruyck, Goedeke Roos, Julie Bouckaert, et Marc F. Lensink. 2018. « Targeting dynamical binding processes in the design of non-antibiotic anti-adhesives by molecular simulation—The example of FimH ». *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071641>.
- Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba, et S. Aizawa. 1992. « Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Molecular Biology* 226 (2): 433-46.
- Kudo, S., Y. Magariyama, et S. Aizawa. 1990. « Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy ». *Nature* 346 (6285): 677-80. <https://doi.org/10.1038/346677a0>.
- Kuhlen, Lucas, Patrizia Abrusci, Steven Johnson, Joseph Gault, Justin Deme, Joseph Caesar, Tobias Dietsche, et al. 2018. « Structure of the core of the type III secretion system export apparatus ». *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (7): 583-90. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0086-9>.
- Kumar, Pardeep, F. Matthew Kuhlmann, Kirandeep Bhullar, Hyungjun Yang, Bruce A. Vallance, Lijun Xia, Qingwei Luo, et James M. Fleckenstein. 2016. « Dynamic interactions of a conserved enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin with intestinal mucins govern epithelium

- engagement and toxin delivery ». *Infection and Immunity* 84 (12): 3608-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00692-16>.
- Kumar, Pardeep, Qingwei Luo, Tim J. Vickers, Alaullah Sheikh, Warren G. Lewis, et James M. Fleckenstein. 2014. « EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin ». *Infection and Immunity* 82 (2): 500-508. <https://doi.org/10.1128/IAI.01078-13>.
- Kutsukake, K., T. Ikebe, et S. Yamamoto. 1999. « Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella* ». *Genes & Genetic Systems* 74 (6): 287-92.
- Kutsukake, K., Y. Ohya, et T. Iino. 1990. « Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 172 (2): 741-47.
- Kuzmin, Peter I., Sergey A. Akimov, Yuri A. Chizmadzhev, Joshua Zimmerberg, et Fredric S. Cohen. 2005. « Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt ». *Biophysical Journal* 88 (2): 1120-33. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048223>.
- Lafont, Frank, et F. Gisou van der Goot. 2005. « Bacterial invasion *via* lipid rafts ». *Cellular Microbiology* 7 (5): 613-20. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00515.x>.
- Lafont, Frank, Guy Tran Van Nhieu, Kentaro Hanada, Philippe Sansonetti, et F. Gisou van der Goot. 2002. « Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction ». *The EMBO Journal* 21 (17): 4449-57.
- Lam, Kwok-Ho, Wing-Sang Ip, Yun-Wah Lam, Sun-On Chan, Thomas Kin-Wah Ling, et Shannon Wing-Ngor Au. 2012. « Multiple conformations of the FliG C-terminal domain provide insight into flagellar motor switching ». *Structure (London, England: 1993)* 20 (2): 315-25. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.020>.
- Lange, Y., M. H. Swaisgood, B. V. Ramos, et T. L. Steck. 1989. « Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (7): 3786-93.
- LaRocca, Timothy J., Priyadarshini Pathak, Salvatore Chiantia, Alvaro Toledo, John R. Silvius, Jorge L. Benach, et Erwin London. 2013. « Proving lipid rafts exist: membrane domains in the prokaryote *Borrelia burgdorferi* have the same properties as eukaryotic lipid rafts ». *PLOS Pathogens* 9 (5): e1003353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003353>.
- Lauga, Eric, Willow R. DiLuzio, George M. Whitesides, et Howard A. Stone. 2006. « Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries ». *Biophysical Journal* 90 (2): 400-412. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069401>.
- Leake, Mark C., Jennifer H. Chandler, George H. Wadhams, Fan Bai, Richard M. Berry, et Judith P. Armitage. 2006. « Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes ». *Nature* 443 (7109): 355-58. <https://doi.org/10.1038/nature05135>.
- Lederberg, J., et T. Iino. 1956. « Phase variation in *Salmonella* ». *Genetics* 41 (5): 743-57.
- Lee, K. K., H. B. Sheth, W. Y. Wong, R. Sherburne, W. Paranchych, R. S. Hodges, C. A. Lingwood, H. Krivan, et R. T. Irvin. 1994. « The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit ». *Molecular Microbiology* 11 (4): 705-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00348.x>.
- Lee, Keel Yong, Sung-Jin Park, Keon Ah Lee, Se-Hwan Kim, Heeyeon Kim, Yasmine Meroz, L. Mahadevan, et al. 2018. « Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATP-

- dependent reactions in a protocellular system ». *Nature Biotechnology* 36 (6): 530-35. <https://doi.org/10.1038/nbt.4140>.
- Lee, Lawrence K., Michael A. Ginsburg, Claudia Crovace, Mhairi Donohoe, et Daniela Stock. 2010. « Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching ». *Nature* 466 (7309): 996-1000. <https://doi.org/10.1038/nature09300>.
- Leffler, H., et C. Svanborg-Edén. 1981. « Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells ». *Infection and Immunity* 34 (3): 920-29.
- Lele, Pushkar P., Richard W. Branch, Vedhavalli S. J. Nathan, et Howard C. Berg. 2012. « Mechanism for adaptive remodeling of the bacterial flagellar switch ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (49): 20018-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212327109>.
- Lele, Pushkar P., Basarab G. Hosu, et Howard C. Berg. 2013. « Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29): 11839-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305885110>.
- Lesuffleur, T., N. Porchet, J. P. Aubert, D. Swallow, J. R. Gum, Y. S. Kim, F. X. Real, et A. Zweibaum. 1993. « Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations ». *Journal of Cell Science* 106 (Pt 3) (novembre): 771-83.
- Levenson, Robert, Hongjun Zhou, et Frederick W. Dahlquist. 2012. « Structural insights into the interaction between the bacterial flagellar motor proteins FliF and FliG ». *Biochemistry* 51 (25): 5052-60. <https://doi.org/10.1021/bi3004582>.
- Levental, Ilya, et Sarah Veatch. 2016. « The continuing mystery of lipid rafts ». *Journal of Molecular Biology* 428 (24 Pt A): 4749-64. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.022>.
- Levental, Kandice R, Eric Malmberg, Yang-Yi Fan, Robert Chapkin, Robert Ernst, et Ilya Levental. 2018. « Homeostatic remodeling of mammalian membranes in response to dietary lipids is essential for cellular fitness ». Preprint. Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/342873>.
- Li, Hui, et Victor Sourjik. 2011. « Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 80 (4): 886-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07557.x>.
- Li, Xinyue, Nancy M. C. Bleumink-Pluym, Yvette M. C. A. Luijkx, Richard W. Wubbolts, Jos P. M. van Putten, et Karin Strijbis. 2019. « MUC1 is a receptor for the *Salmonella* SiiE adhesin that enables apical invasion into enterocytes ». *PLOS Pathogens* 15 (2): e1007566. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007566>.
- Lim, Jenson, Daniel H. Stones, Catherine Alice Hawley, Charlie Anne Watson, et Anne Marie Krachler. 2014. « Multivalent adhesion molecule 7 clusters act as signaling platform for host cellular GTPase activation and facilitate epithelial barrier dysfunction ». *PLoS Pathogens* 10 (9): e1004421. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004421>.
- Lira, Rafael B., Rumiana Dimova, et Karin A. Riske. 2014. « Giant unilamellar vesicles formed by hybrid films of agarose and lipids display altered mechanical properties ». *Biophysical Journal* 107 (7): 1609-19. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.009>.
- Liu, Bin, Bo Hu, Zhemin Zhou, Dan Guo, Xi Guo, Peng Ding, Lu Feng, et Lei Wang. 2012. « A novel non-homologous recombination-mediated mechanism for *Escherichia coli* unilateral flagellar phase variation ». *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4530-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gks040>.

- Liu, X., et P. Matsumura. 1994. « The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons ». *Journal of Bacteriology* 176 (23): 7345-51.
- Lombard, Jonathan. 2014. « Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research ». *Biology Direct* 9 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>.
- Lopez, Daniel, et Gudrun Koch. 2017. « Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview ». *Current Opinion in Microbiology* 36 (avril): 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.001>.
- López Mora, Néstor, Jesper S. Hansen, Yue Gao, Andrew A. Ronald, Roxanne Kieltyka, Noah Malmstadt, et Alexander Kros. 2014. « Preparation of size tunable giant vesicles from cross-linked dextran(ethylene glycol) hydrogels ». *Chemical Communications (Cambridge, England)* 50 (16): 1953-55. <https://doi.org/10.1039/c3cc49144g>.
- Luo, Qingwei, Pardeep Kumar, Tim J. Vickers, Alaullah Sheikh, Warren G. Lewis, David A. Rasko, Jeticia Sistrunk, et James M. Fleckenstein. 2014. « Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes a highly conserved mucin-degrading metalloprotease to effectively engage intestinal epithelial cells ». *Infection and Immunity* 82 (2): 509-21. <https://doi.org/10.1128/IAI.01106-13>.
- Macnab, R. M. 1992. « Genetics and biogenesis of bacterial flagella ». *Annual Review of Genetics* 26: 131-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.001023>.
- Macnab, Robert M. 2003. « How bacteria assemble flagella ». *Annual Review of Microbiology* 57: 77-100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>.
- Mahmoud, Rasha Y., Daniel Henry Stones, Wenqin Li, Mohamed Emar, Ramadan A. El-Domany, Depu Wang, Yili Wang, Anne Marie Krachler, et Jun Yu. 2016. « The multivalent adhesion molecule SSO1327 plays a key role in *Shigella sonnei* pathogenesis ». *Molecular Microbiology* 99 (4): 658-73. <https://doi.org/10.1111/mmi.13255>.
- Maki-Yonekura, Saori, Koji Yonekura, et Keiichi Namba. 2003. « Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15528-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.2534343100>.
- . 2010. « Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (4): 417-22. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1774>.
- Marczak, Agnieszka. 2009. « Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human Erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde ». *Bioelectrochemistry* 74 (2): 236-39. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.11.004>.
- Markham, Jonathan E., Jia Li, Edgar B. Cahoon, et Jan G. Jaworski. 2006. « Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (32): 22684-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604050200>.
- Marquardt, Drew, Barbara Geier, et Georg Pabst. 2015. « Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems ». *Membranes* 5 (2): 180-96. <https://doi.org/10.3390/membranes5020180>.
- Martínez-Maqueda, Daniel, Beatriz Miralles, et Isidra Recio. 2015. « HT29 cell line ». In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers, 113-24. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11.

- Maté, Sabina M., Romina F. Vázquez, Vanesa S. Herlax, María A. Daza Millone, María L. Fanani, Bruno Maggio, María E. Vela, et Laura S. Bakás. 2014. « Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for *Escherichia coli* α -hemolysin: a real-time study ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (7): 1832-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.02.022>.
- Matosevic, Sandro, et Brian M. Paegel. 2013. « Layer-by-layer cell membrane assembly ». *Nature Chemistry* 5 (11): 958-63. <https://doi.org/10.1038/nchem.1765>.
- Matsunami, Hideyuki, Clive S. Barker, Young-Ho Yoon, Matthias Wolf, et Fadel A. Samatey. 2016. « Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions ». *Nature Communications* 7: 13425. <https://doi.org/10.1038/ncomms13425>.
- Mayor, S., et F. R. Maxfield. 1995. « Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment ». *Molecular Biology of the Cell* 6 (7): 929-44.
- Mazzarello, Paolo. 1999. « A unifying concept: the history of cell theory ». *Nature Cell Biology* 1 (1): E13. <https://doi.org/10.1038/8964>.
- McLaughlin, Stuart, et Diana Murray. 2005. « Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics ». *Nature* 438 (7068): 605-11. <https://doi.org/10.1038/nature04398>.
- McLellan, Lisa K., et David A. Hunstad. 2016. « Urinary tract infection: pathogenesis and outlook ». *Trends in Molecular Medicine* 22 (11): 946-57. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>.
- McMahon, Harvey T., et Emmanuel Boucrot. 2015. « Membrane curvature at a glance ». *Journal of Cell Science* 128 (6): 1065-70. <https://doi.org/10.1242/jcs.114454>.
- McMurry, Jonathan L., John S. Van Arnam, May Kihara, et Robert M. Macnab. 2004. « Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery ». *Journal of Bacteriology* 186 (22): 7586-92. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7586-7592.2004>.
- McNeilly, Tom N., Mairi C. Mitchell, Tracy Rosser, Sean McAteer, J. Christopher Low, David G. E. Smith, John F. Huntley, Arvind Mahajan, et David L. Gally. 2010. « Immunization of cattle with a combination of purified Intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge ». *Vaccine* 28 (5): 1422-28. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.076>.
- Meenan, Nicola A. G., Livia Visai, Viviana Valtulina, Ulrich Schwarz-Linek, Nicole C. Norris, Sivashankarappa Gurusiddappa, Magnus Höök, Pietro Speziale, et Jennifer R. Potts. 2007. « The tandem β -zipper model defines high affinity fibronectin-binding repeats within *Staphylococcus aureus* FnBPA ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (35): 25893-902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703063200>.
- Meer, G. van, et K. Simons. 1986. « The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells ». *The EMBO Journal* 5 (7): 1455-64.
- Meer, Gerrit van, et Anton I. P. M. de Kroon. 2011. « Lipid map of the mammalian cell ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 1): 5-8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- Meer, Gerrit van, Dennis R. Voelker, et Gerald W. Feigenson. 2008. « Membrane lipids: where they are and how they behave ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (2): 112-24. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.

- Méléard, Philippe, Luis A. Bagatolli, et Tanja Pott. 2009. « Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions ». *Methods in Enzymology* 465: 161-76. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)65009-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)65009-6).
- Melville, Stephen, et Lisa Craig. 2013. « Type IV pili in Gram-positive bacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 77 (3): 323-41. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-12>.
- Merino, Susana, et Juan M. Tomás. 2014. « Gram-negative flagella glycosylation ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2840-57. <https://doi.org/10.3390/ijms15022840>.
- Meuskens, Ina, Athanasios Saragliadis, Jack C. Leo, et Dirk Linke. 2019. « Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions ». *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01163>.
- Minamino, T., et R. M. MacNab. 2000. « FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity ». *Molecular Microbiology* 37 (6): 1494-1503.
- Minamino, T., S. Yamaguchi, et R. M. Macnab. 2000. « Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella* ». *Journal of Bacteriology* 182 (11): 3029-36.
- Minamino, Tohru. 2018. « Hierarchical protein export mechanism of the bacterial flagellar type III protein export apparatus ». *FEMS Microbiology Letters* 365 (12). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny117>.
- Minamino, Tohru, Hedda U. Ferris, Nao Moriya, May Kihara, et Keiichi Namba. 2006. « Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar Type III export apparatus ». *Journal of Molecular Biology* 362 (5): 1148-58. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.004>.
- Minamino, Tohru, et Katsumi Imada. 2015. « The bacterial flagellar motor and its structural diversity ». *Trends in Microbiology* 23 (5): 267-74. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.011>.
- Minamino, Tohru, Katsumi Imada, Miki Kinoshita, Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, et Keiichi Namba. 2011. « Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor ». *PLoS Biology* 9 (5): e1000616. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000616>.
- Minamino, Tohru, Katsumi Imada, et Keiichi Namba. 2008. « Molecular motors of the bacterial flagella ». *Current Opinion in Structural Biology* 18 (6): 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.006>.
- Minamino, Tohru, Miki Kinoshita, Noritaka Hara, Shiori Takeuchi, Akira Hida, Satomi Koya, Helen Glenwright, Katsumi Imada, Phillip D. Aldridge, et Keiichi Namba. 2012. « Interaction of bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates ». *Molecular Microbiology* 83 (4): 775-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07964.x>.
- Minamino, Tohru, Miki Kinoshita, Katsumi Imada, et Keiichi Namba. 2012. « Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export ». *Molecular Microbiology* 83 (1): 168-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07924.x>.
- Minamino, Tohru, Yusuke V. Morimoto, Noritaka Hara, et Keiichi Namba. 2011. « An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export ». *Nature Communications* 2 (septembre): 475. <https://doi.org/10.1038/ncomms1488>.

- Minamino, Tohru, Yusuke V. Morimoto, Akihiro Kawamoto, Hiroyuki Terashima, et Katsumi Imada. 2018. « *Salmonella* flagellum ». *Salmonella - A Re-Emerging Pathogen*, juillet. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73277>.
- Minamino, Tohru, Yusuke V. Morimoto, Miki Kinoshita, Phillip D. Aldridge, et Keiichi Namba. 2014. « The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis ». *Scientific Reports* 4 (décembre): 7579. <https://doi.org/10.1038/srep07579>.
- Minamino, Tohru, et Keiichi Namba. 2008. « Distinct roles of the Flil ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export ». *Nature* 451 (7177): 485-88. <https://doi.org/10.1038/nature06449>.
- Minamino, Tohru, Yumiko Saijo-Hamano, Yukio Furukawa, Bertha González-Pedrajo, Robert M. Macnab, et Keiichi Namba. 2004. « Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein ». *Journal of Molecular Biology* 341 (2): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.012>.
- Minamino, Tohru, Naoya Terahara, Seiji Kojima, et Keiichi Namba. 2018. « Autonomous control mechanism of stator assembly in the bacterial flagellar motor in response to changes in the environment ». *Molecular Microbiology* 109 (6): 723-34. <https://doi.org/10.1111/mmi.14092>.
- Minamino, Tohru, Shinsuke D. J. Yoshimura, Yusuke V. Morimoto, Bertha González-Pedrajo, Nobunori Kami-Ike, et Keiichi Namba. 2009. « Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-Flil complex to the bacterial flagellar type III export apparatus ». *Molecular Microbiology* 74 (6): 1471-83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06946.x>.
- Mittelviehhaus, Maximilian, Daniel B. Müller, Tomaso Zambelli, et Julia A. Vorholt. 2019. « A modular atomic force microscopy approach reveals a large range of hydrophobic adhesion forces among bacterial members of the leaf microbiota ». *The ISME Journal* 13 (7): 1878-82. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0404-1>.
- Mizuno, Shino, Hirokazu Amida, Naohiro Kobayashi, Shin-Ichi Aizawa, et Shin-Ichi Tate. 2011. « The NMR structure of FliK, the trigger for the switch of substrate specificity in the flagellar type III secretion apparatus ». *Journal of Molecular Biology* 409 (4): 558-73. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.008>.
- Montes, L.-Ruth, Alicia Alonso, Felix M. Goñi, et Luis A. Bagatolli. 2007. « Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions ». *Biophysical Journal* 93 (10): 3548-54. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.116228>.
- Mora, Nestor Lopez, Yue Gao, M. Gertrude Gutierrez, Justin Peruzzi, Ivan Bakker, Ruud J. R. W. Peters, Bianka Siewert, et al. 2017. « Evaluation of dextran(ethylene glycol) hydrogel films for giant unilamellar lipid vesicle production and their application for the encapsulation of polymersomes ». *Soft Matter* 13 (33): 5580-88. <https://doi.org/10.1039/C7SM00551B>.
- Morimoto, Yusuke V., Mariko Ito, Koichi D. Hiraoka, Yong-Suk Che, Fan Bai, Nobunori Kami-Ike, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2014. « Assembly and stoichiometry of FliF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body ». *Molecular Microbiology* 91 (6): 1214-26. <https://doi.org/10.1111/mmi.12529>.

- Morimoto, Yusuke V., Nobunori Kami-Ike, Tomoko Miyata, Akihiro Kawamoto, Takayuki Kato, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2016. « High-resolution pH imaging of living bacterial cells to detect local pH differences ». *MBio* 7 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01911-16>.
- Morimoto, Yusuke V., et Tohru Minamino. 2014. « Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor ». *Biomolecules* 4 (1): 217-34. <https://doi.org/10.3390/biom4010217>.
- Morimoto, Yusuke V., Shuichi Nakamura, Koichi D. Hiraoka, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2013. « Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation ». *Journal of Bacteriology* 195 (3): 474-81. <https://doi.org/10.1128/JB.01971-12>.
- Morimoto, Yusuke V., Shuichi Nakamura, Nobunori Kami-ike, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2010. « Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor ». *Molecular Microbiology* 78 (5): 1117-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07391.x>.
- Movsesian, Nareh, Matthew Tittensor, Golnaz Dianat, Malancha Gupta, et Noah Malmstadt. 2018. « Giant lipid vesicle formation using vapor-deposited charged porous polymers ». *Langmuir* 34 (30): 9025-35. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00736>.
- Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien, et W. C. Wescott. 1962. « Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system ». *Nature* 194 (juin): 979-80.
- Mulla, Yuval, Anders Aufderhorst-Roberts, et Gijssje H. Koenderink. 2018. « Shaping up synthetic cells ». *Physical Biology* 15 (4): 041001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aab923>.
- Muskotál, Adél, Réka Király, Anett Sebestyén, Zoltán Gugolya, Barbara M. Végh, et Ferenc Vonderviszt. 2006. « Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin ». *FEBS Letters* 580 (16): 3916-20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.024>.
- Nakamura, Manabu T., et Takayuki Y. Nara. 2004. « Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases ». *Annual Review of Nutrition* 24: 345-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211>.
- Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab, et K. Kutsukake. 1999. « Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella Typhimurium* ». *Journal of Bacteriology* 181 (5): 1555-61.
- Nguyen, Ylan, Seiji Sugiman-Marangos, Hanjeong Harvey, Stephanie D. Bell, Carmen L. Charlton, Murray S. Junop, et Lori L. Burrows. 2015. « *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (1): 601-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616904>.
- Nicolson, Garth L. 2014. « The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1838 (6): 1451-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>.
- Nithichanon, Arnone, Darawan Rinchai, Alessandro Gori, Patricia Lassaux, Claudio Peri, Oscar Conchillio-Solé, Mario Ferrer-Navarro, et al. 2015. « Sequence- and structure-based immunoreactive epitope discovery for *Burkholderia pseudomallei* flagellin ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (7): e0003917. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003917>.

- Noireaux, Vincent, et Albert Libchaber. 2004. « A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51): 17669-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408236101>.
- Oh, Yoo Jin, Michael Hubauer-Brenner, Hermann J. Gruber, Yidan Cui, Lukas Traxler, Christine Siligan, Sungsu Park, et Peter Hinterdorfer. 2016. « Curli mediate bacterial adhesion to fibronectin via tensile multiple bonds ». *Scientific Reports* 6 (septembre): 33909. <https://doi.org/10.1038/srep33909>.
- Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, et T. Lino. 1992. « A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella* Typhimurium: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F ». *Molecular Microbiology* 6 (21): 3149-57.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab, et T. lino. 1994. « FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella* Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 176 (8): 2272-81.
- Okumura, Ryu, Takashi Kurakawa, Takashi Nakano, Hisako Kayama, Makoto Kinoshita, Daisuke Motooka, Kazuyoshi Gotoh, et al. 2016. « Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia ». *Nature* 532 (7597): 117-21. <https://doi.org/10.1038/nature17406>.
- Okumura, Yukihisa, Hao Zhang, Takuya Sugiyama, et Yuuichi Iwata. 2007. « Electroformation of giant vesicles on a non-slectroconductive substrate ». *Journal of the American Chemical Society* 129 (6): 1490-91. <https://doi.org/10.1021/ja068127x>.
- Osterman, I. A., Yu Yu Dikhtyar, A. A. Bogdanov, O. A. Dontsova, et P. V. Sergiev. 2015. « Regulation of flagellar gene expression in bacteria ». *Biochemistry. Biokhimiia* 80 (11): 1447-56. <https://doi.org/10.1134/S000629791511005X>.
- Ota, Sadao, Satoko Yoshizawa, et Shoji Takeuchi. 2009. « Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48 (35): 6533-37. <https://doi.org/10.1002/anie.200902182>.
- Ozin, Amanda J., Laurent Claret, Frederic Auvray, et Colin Hughes. 2003. « The FliS chaperone selectively binds the disordered flagellin C-terminal D0 domain central to polymerisation ». *FEMS Microbiology Letters* 219 (2): 219-24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01208-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01208-9).
- Pan, Jianjun, Drew Marquardt, Frederick A. Heberle, Norbert Kučerka, et John Katsaras. 2014. « Revisiting the bilayer structures of fluid phase phosphatidylglycerol lipids: accounting for exchangeable hydrogens ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (11): 2966-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.009>.
- Pang, Lijuan, Simon Kleeb, Katrin Lemme, Said Rabbani, Meike Scharenberg, Adam Zalewski, Florentina Schädler, Oliver Schwardt, et Beat Ernst. 2012. « FimH antagonists: structure-activity and structure-property relationships for biphenyl α -D-mannopyranosides ». *ChemMedChem* 7 (8): 1404-22. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200125>.
- Paradis, Guillaume, Fabienne F. V. Chevance, Willisa Liou, Thibaud T. Renault, Kelly T. Hughes, Simon Rainville, et Marc Erhardt. 2017. « Variability in bacterial flagella re-growth patterns after breakage ». *Scientific Reports* 7 (1): 1282. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01302-5>.
- Parasassi, T, G De Stasio, A d'Ubaldo, et E Gratton. 1990. « Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. » *Biophysical Journal* 57 (6): 1179-86.

- Parisio, Giulia, Alberta Ferrarini, et Maria Maddalena Sperotto. 2016. « Model studies of lipid flip-flop in membranes ». *International Journal of Advances in Engineering Sciences and Applied Mathematics* 8 (janvier). <https://doi.org/10.1007/s12572-015-0155-9>.
- Paton, Adrienne W., Renato Morona, et James C. Paton. 2006. « Designer probiotics for prevention of enteric infections ». *Nature Reviews. Microbiology* 4 (3): 193-200. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1349>.
- Patterson-Delafield, J., R. J. Martinez, B. A. Stocker, et S. Yamaguchi. 1973. « A new fla gene in *Salmonella Typhimurium*--FlaR--and its mutant phenotype-superhooks ». *Archiv Fur Mikrobiologie* 90 (2): 107-20.
- Paul, Koushik, et David F. Blair. 2006. « Organization of FliN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 188 (7): 2502-11. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2502-2511.2006>.
- Paul, Koushik, Marc Erhardt, Takanori Hirano, David F. Blair, et Kelly T. Hughes. 2008. « Energy source of flagellar type III secretion ». *Nature* 451 (7177): 489-92. <https://doi.org/10.1038/nature06497>.
- Pautot, Sophie, Barbara J. Frisken, et D. A. Weitz. 2003a. « Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion ». *Langmuir* 19 (7): 2870-79. <https://doi.org/10.1021/la026100v>.
- . 2003b. « Engineering asymmetric vesicles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (19): 10718-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1931005100>.
- Pavlič, Janez I., Julia Genova, George Popkirov, Veronika Kralj-Iglič, Aleš Iglič, et Marin D. Mitov. 2011. « Mechanoformation of neutral giant phospholipid vesicles in high ionic strength solution ». *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (8): 727-31. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.08.005>.
- Pécheur, Eve-Isabelle, Isabelle Martin, Olaf Maier, Udo Bakowsky, Jean-Marie Ruyschaert, et Dick Hoekstra. 2002. « Phospholipid species act as modulators in P97/P47-mediated fusion of Golgi membranes ». *Biochemistry* 41 (31): 9813-23. <https://doi.org/10.1021/bi0259195>.
- Persat, Alexandre, Carey D. Nadell, Minyoung Kevin Kim, Francois Ingremeau, Albert Siryaporn, Knut Drescher, Ned S. Wingreen, Bonnie L. Bassler, Zemer Gitai, et Howard A. Stone. 2015a. « The mechanical world of bacteria ». *Cell* 161 (5): 988-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005>.
- Persat, Alexandre, Yuki F. Inclan, Joanne N. Engel, Howard A. Stone, et Zemer Gitai. 2015b. « Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): 7563-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>.
- Peruzzi, Justin, M. Gertrude Gutierrez, Kylee Mansfield, et Noah Malmstadt. 2016. « Dynamics of hydrogel-assisted giant unilamellar vesicle formation from unsaturated lipid systems ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 32 (48): 12702-9. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01889>.
- Pezeshkian, Weria, Haifei Gao, Senthil Arumugam, Ulrike Becken, Patricia Bassereau, Jean-Claude Florent, John Hjort Ipsen, Ludger Johannes, et Julian C. Shillcock. 2017. « Mechanism of shiga toxin clustering on membranes ». *ACS Nano* 11 (1): 314-24. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b05706>.

- Pluskal, Tomáš, Sandra Castillo, Alejandro Villar-Briones, et Matej Orešič. 2010. « MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data ». *BMC Bioinformatics* 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>.
- Postel, Sandra, Daniel Deredge, Daniel A. Bonsor, Xiong Yu, Kay Diederichs, Saskia Helmsing, Aviv Vromen, et al. 2016. « Bacterial flagellar capping proteins adopt diverse oligomeric states ». *ELife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18857>.
- Pott, Tanja, Hélène Bouvrais, et Philippe Méléard. 2008. « Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions ». *Chemistry and Physics of Lipids* 154 (2): 115-19. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.03.008>.
- Prévost, Coline, Hongxia Zhao, John Manzi, Emmanuel Lemichez, Pekka Lappalainen, Andrew Callan-Jones, et Patricia Bassereau. 2015. « IRSp53 senses negative membrane curvature and phase separates along membrane tubules ». *Nature Communications* 6 (octobre): 8529. <https://doi.org/10.1038/ncomms9529>.
- Quazi, F. et R.S. Molday. 2011. « Lipid transport by mammalian ABC proteins ». *Essays in biochemistry* 50: 265–290.
- Raghupathy, Riya, Anupama Ambika Anilkumar, Anirban Polley, Parvinder Pal Singh, Mahipal Yadav, Charles Johnson, Sharad Suryawanshi, et al. 2015. « Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins ». *Cell* 161 (3): 581-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.048>.
- Rawicz, W, K C Olbrich, T McIntosh, D Needham, et E Evans. 2000. « Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers ». *Biophysical Journal* 79 (1): 328-39.
- Reardon-Robinson, Melissa E., et Hung Ton-That. 2014. « Assembly and function of *Corynebacterium diphtheriae* pili ». In *Corynebacterium Diphtheriae and Related Toxigenic Species: Genomics, Pathogenicity and Applications*, édité par Andreas Burkovski, 123-41. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7624-1_7.
- Reeves, J. P., et R. M. Dowben. 1969. « Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles ». *Journal of Cellular Physiology* 73 (1): 49-60. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040730108>.
- Reid, Stuart W., Mark C. Leake, Jennifer H. Chandler, Chien-Jung Lo, Judith P. Armitage, et Richard M. Berry. 2006. « The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (21): 8066-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509932103>.
- Remaut, Han, Rebecca J. Rose, Thomas J. Hannan, Scott J. Hultgren, Sheena E. Radford, Alison E. Ashcroft, et Gabriel Waksman. 2006. « Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism ». *Molecular Cell* 22 (6): 831-42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.033>.
- Renault, Thibaud T., Anthony O. Abraham, Tobias Bergmiller, Guillaume Paradis, Simon Rainville, Emmanuelle Charpentier, Călin C. Guet, et al. 2017. « Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism ». *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23136>.
- Ribeiro, Marta, Marco Domingues, João Freire, Nuno Santos, et Miguel Castanho. 2012. « Translocating the blood-brain barrier using electrostatics ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00044>.

- Rideau, Emeline, Frederik R. Wurm, et Katharina Landfester. 2019. « Self-assembly of giant unilamellar vesicles by film hydration methodologies ». *Advanced Biosystems* 3 (6): 1800324. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800324>.
- Risselada, H. Jelger, et Siewert J. Marrink. 2009. « Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations ». *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 11 (12): 2056-67. <https://doi.org/10.1039/b818782g>.
- Robertson, J. D. 1960. « The molecular structure and contact relationships of cell membranes ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 10: 343-418.
- Rodriguez, Nicolas, Frédéric Pincet, et Sophie Cribier. 2005. « Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy ». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 42 (2): 125-30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.01.010>.
- Roig, Xavier. 2000. « Handbook of bacterial adhesion. Principles, methods and applications ». Yuehuei H. An, Richard J. Friedman. *International Microbiology* 3 (septembre): 196-97.
- Rosenberg, Mel, et Staffan Kjelleberg. 1986. « Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion ». In *Advances in Microbial Ecology*, édité par K. C. Marshall, 353-93. *Advances in Microbial Ecology*. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_8.
- Rossez, Yannick, Ashleigh Holmes, Eliza B. Wolfson, David L. Gally, Arvind Mahajan, Henriette L. Pedersen, William G. T. Willats, Ian K. Toth, et Nicola J. Holden. 2014. « Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants ». *Environmental Microbiology* 16 (7): 2181-95. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12315>.
- Rossez, Yannick, Eliza B. Wolfson, Ashleigh Holmes, David L. Gally, et Nicola J. Holden. 2015. « Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms ». *PLoS Pathogens* 11 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004483>.
- Rossi, Claire, Elisabeth Briand, Pierre Parot, Michael Odorico, et Joël Chopineau. 2007. « Surface response methodology for the study of supported membrane formation ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 111 (26): 7567-76. <https://doi.org/10.1021/jp0686792>.
- Rossi, Claire, Hélène Cazzola, Nicola J. Holden, et Yannick Rossez. 2019. « Bacterial adherence to plant and animal surfaces via adhesin-lipid interactions ». In *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, édité par Howard Goldfine, 1-21. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_13-1.
- Rossi, Claire, Johanne Homand, Cécile Bauche, Hayfa Hamdi, Daniel Ladant, et Joël Chopineau. 2003. « Differential Mechanisms for Calcium-Dependent Protein/Membrane Association as Evidenced from SPR-Binding Studies on Supported Biomimetic Membranes ». *Biochemistry* 42 (51): 15273-83. <https://doi.org/10.1021/bi035336a>.
- Rottner, Klemens, Theresia E. B. Stradal, et Juergen Wehland. 2005. « Bacteria-Host-Cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion ». *Developmental Cell* 9 (1): 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.002>.
- Roy, Koushik, George M. Hilliard, David J. Hamilton, Jiwen Luo, Marguerite M. Ostmann, et James M. Fleckenstein. 2009. « Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells ». *Nature* 457 (7229): 594-98. <https://doi.org/10.1038/nature07568>.

- Saarikangas, Juha, Hongxia Zhao, et Pekka Lappalainen. 2010. « Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides ». *Physiological Reviews* 90 (1): 259-89. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2009>.
- Sajó, Ráchel, Károly Liliom, Adél Muskotál, Agnes Klein, Péter Závodszky, Ferenc Vonderviszt, et József Dobó. 2014. « Soluble components of the flagellar export apparatus, FliI, FliJ, and FliH, do not deliver flagellin, the major filament protein, from the cytosol to the export gate ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (11): 2414-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.004>.
- Sajó, Ráchel, Orsolya Tőke, István Hajdú, Hajnalka Jankovics, András Micsonai, József Dobó, József Kardos, et Ferenc Vonderviszt. 2016. « Structural plasticity of the *Salmonella* FliS flagellar export chaperone ». *FEBS Letters* 590 (8): 1103-13. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12149>.
- Sakai, Tomofumi, Yumi Inoue, Naoya Terahara, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2018. « A triangular loop of domain D1 of FlgE is essential for hook assembly but not for the mechanical function ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (2): 1789-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.037>.
- Samatey, F. A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, et K. Namba. 2001. « Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling ». *Nature* 410 (6826): 331-37. <https://doi.org/10.1038/35066504>.
- Samatey, Fadel A., Hideyuki Matsunami, Katsumi Imada, Shigehiro Nagashima, Tanvir R. Shaikh, Dennis R. Thomas, James Z. Chen, David J. Derosier, Akio Kitao, et Keiichi Namba. 2004. « Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism ». *Nature* 431 (7012): 1062-68. <https://doi.org/10.1038/nature02997>.
- Sampaio, Julio L., Mathias J. Gerl, Christian Klose, Christer S. Ejsing, Hartmut Beug, Kai Simons, et Andrej Shevchenko. 2011. « Membrane lipidome of an epithelial cell line ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (5): 1903-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019267108>.
- Sankaram, M. B., et T. E. Thompson. 1990. « Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ²H nuclear magnetic resonance study ». *Biochemistry* 29 (47): 10676-84.
- Sarkar, Mayukh K., Koushik Paul, et David Blair. 2010. « Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20): 9370-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000935107>.
- Sato, Yoshiharu, Akiko Takaya, Chakib Mouslim, Kelly T. Hughes, et Tomoko Yamamoto. 2014. « FliT selectively enhances proteolysis of FlhC subunit in FlhD₄C₂ complex by an ATP-dependent protease, ClpXP ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (47): 33001-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593749>.
- Sato, Yusuke, et Masahiro Takinoue. 2019. « Creation of artificial cell-like structures promoted by microfluidics technologies ». *Micromachines* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/mi10040216>.
- Sauer, Maximilian M., Roman P. Jakob, Jonathan Eras, Sefer Baday, Deniz Eriş, Giulio Navarra, Simon Bernèche, Beat Ernst, Timm Maier, et Rudi Glockshuber. 2016. « Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH ». *Nature Communications* 7 (mars): 10738. <https://doi.org/10.1038/ncomms10738>.

- Schlumberger, Markus C., Andreas J. Müller, Kristin Ehrbar, Brit Winnen, Iwan Duss, Bärbel Stecher, et Wolf-Dietrich Hardt. 2005. « Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (35): 12548-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503407102>.
- Servin, Alain L. 2014. « Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (4): 823-69. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-14>.
- Sezgin, Erdinc, Hermann-Josef Kaiser, Tobias Baumgart, Petra Schwille, Kai Simons, et Ilya Levental. 2012. « Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles ». *Nature Protocols* 7 (6): 1042-51. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.059>.
- Sezgin, Erdinc, Ilya Levental, Satyajit Mayor, et Christian Eggeling. 2017. « The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (6): 361-74. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- Shaikh, Tanvir R., Dennis R. Thomas, James Z. Chen, Fadel A. Samatey, Hideyuki Matsunami, Katsumi Imada, Keiichi Namba, et David J. Derosier. 2005. « A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella* Typhimurium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (4): 1023-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409020102>.
- Shibata, Satoshi, Noriko Takahashi, Fabienne F. V. Chevance, Joyce E. Karlinsey, Kelly T. Hughes, et Shin-Ichi Aizawa. 2007. « FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler ». *Molecular Microbiology* 64 (5): 1404-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05750.x>.
- Shum, Ho Cheung, Daeyeon Lee, Insun Yoon, Tom Kodger, et David A. Weitz. 2008. « Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 24 (15): 7651-53. <https://doi.org/10.1021/la801833a>.
- Simons, K., et E. Ikonen. 1997. « Functional rafts in cell membranes ». *Nature* 387 (6633): 569-72. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- Sinensky, M. 1974. « Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (2): 522-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>.
- Singer, S. J., et G. L. Nicolson. 1972. « The fluid mosaic model of the structure of cell membranes ». *Science (New York, N.Y.)* 175 (4023): 720-31.
- Song, Wan Seok, So Yeon Cho, Ho Jeong Hong, Sun Cheol Park, et Sung-Il Yoon. 2017. « Self-oligomerizing structure of the flagellar cap protein FliD and its implication in filament assembly ». *Journal of Molecular Biology* 429 (6): 847-57. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.001>.
- Song, Wan Seok, Ye Ji Jeon, Byeol Namgung, Minsun Hong, et Sung-Il Yoon. 2017. « A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin ». *Scientific Reports* 7: 40878. <https://doi.org/10.1038/srep40878>.
- Song, Wan Seok, et Sung-il Yoon. 2014. « Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 444 (2): 109-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.008>.
- Song, Y. C., S. Jin, H. Louie, D. Ng, R. Lau, Y. Zhang, R. Weerasekera, et al. 2004. « FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds

- epithelial cells and influences cell invasion ». *Molecular Microbiology* 53 (2): 541-53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04175.x>.
- Sorenson, Margareta K., Soumya S. Ray, et Seth A. Darst. 2004. « Crystal structure of the flagellar sigma/anti-sigma complex σ^{28} /FlgM reveals an intact sigma factor in an inactive conformation ». *Molecular Cell* 14 (1): 127-38.
- Stathopoulos, C., D. R. Hendrixson, D. G. Thanassi, S. J. Hultgren, J. W. St Geme, et R. Curtiss. 2000. « Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story ». *Microbes and Infection* 2 (9): 1061-72.
- Steck, Theodore L., et Yvonne Lange. 2018. « Transverse distribution of plasma membrane bilayer cholesterol: picking sides ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 19 (10): 750-60. <https://doi.org/10.1111/tra.12586>.
- Stein, Hannah, Susann Spindler, Navid Bonakdar, Chun Wang, et Vahid Sandoghdar. 2017. « Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations ». *Frontiers in Physiology* 8: 63. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00063>.
- Stewart, J. C. 1980. « Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate ». *Analytical Biochemistry* 104 (1): 10-14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9).
- Stoeckenius, Walther, et Donald M. Engelman. 1969. « Current models for the structure of biological membranes ». *The Journal of Cell Biology* 42 (3): 613-46.
- Stones, Daniel Henry, et Anne Marie Krachler. 2016. « Against the Tide: The Role of Bacterial Adhesion in Host Colonization ». *Biochemical Society Transactions* 44 (6): 1571-80. <https://doi.org/10.1042/BST20160186>.
- Strahl, H., S. Ronneau, B. Solana González, D. Klutsch, C. Schaffner-Barbero, et L. W. Hamoen. 2015. « Transmembrane protein sorting driven by membrane curvature ». *Nature Communications* 6 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms9728>.
- Suzuki, Hirofumi, Koji Yonekura, et Keiichi Namba. 2004. « Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis ». *Journal of Molecular Biology* 337 (1): 105-13. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.034>.
- Sze, Alice, David Erickson, Liqing Ren, et Dongqing Li. 2003. « Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow ». *Journal of Colloid and Interface Science* 261 (2): 402-10. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5).
- Taguchi, Fumiko, Masanobu Yamamoto, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Masako Iwaki, Mitsuru Yoshida, Tadashi Ishii, Tomoyuki Konishi, et Yuki Ichinose. 2010. « Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 ». *Microbiology*, 156 (1): 72-80. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030700-0>.
- Tan, Felicia Y. Y., Christoph M. Tang, et Rachel M. Exley. 2015. « Sugar coating: bacterial protein glycosylation and host-microbe interactions ». *Trends in Biochemical Sciences* 40 (7): 342-50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.016>.
- Tan, Yung-Chieh, Kanaka Hettiarachchi, Maria Siu, Yen-Ru Pan, et Abraham Phillip Lee. 2006. « Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles ». *Journal of the American Chemical Society* 128 (17): 5656-58. <https://doi.org/10.1021/ja056641h>.

- Tanasescu, Radu, Ute Mettal, Adai Colom, Aurélien Roux, et Andreas Zumbuehl. 2018. « Facile and rapid formation of giant vesicles from glass beads ». *Polymers* 10 (1). <https://doi.org/10.3390/polym10010054>.
- Tanford, C. 1978. « The hydrophobic effect and the organization of living matter ». *Science (New York, N.Y.)* 200 (4345): 1012-18.
- Tawk, Caroline, Giulia Nigro, Ines Rodrigues Lopes, Carmen Aguilar, Clivia Lisowski, Miguel Mano, Philippe Sansonetti, Jörg Vogel, et Ana Eulalio. 2018. « Stress-induced host membrane remodeling protects from infection by non-motile bacterial pathogens ». *The EMBO Journal* 37 (23). <https://doi.org/10.15252/embj.201798529>.
- Terahara, Naoya, Yumi Inoue, Noriyuki Kodera, Yusuke V. Morimoto, Takayuki Uchihashi, Katsumi Imada, Toshio Ando, Keiichi Namba, et Tohru Minamino. 2018. « Insight into structural remodeling of the FlhA ring responsible for bacterial flagellar type III protein export ». *Science Advances* 4 (4): eaao7054. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao7054>.
- Thomas, Joanne, Graham P. Stafford, et Colin Hughes. 2004. « Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (11): 3945-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307223101>.
- Thomas, Wendy E., Lina M. Nilsson, Manu Forero, Evgeni V. Sokurenko, et Viola Vogel. 2004. « Shear-dependent “stick-and-roll” adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 53 (5): 1545-57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04226.x>.
- Tien, H. T., et A. L. Diana. 1967. « Some physical properties of bimolecular lipid membranes produced from new lipid solutions ». *Nature* 215 (5106): 1199-1200.
- Tipping, Murray J., Nicolas J. Delalez, Ren Lim, Richard M. Berry, et Judith P. Armitage. 2013. « Load-dependent assembly of the bacterial flagellar motor ». *MBio* 4 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-13>.
- Togashi, F., S. Yamaguchi, M. Kihara, S. I. Aizawa, et R. M. Macnab. 1997. « An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella Typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in *motA* and *motB* ». *Journal of Bacteriology* 179 (9): 2994-3003. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.2994-3003.1997>.
- Toledo, Alvaro, et Jorge L. Benach. 2015. « Hijacking and use of host lipids by intracellular pathogens ». *Microbiology spectrum* 3 (6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0001-2014>.
- Totsika, Makrina. 2017. « Disarming pathogens: benefits and challenges of antimicrobials that target bacterial virulence instead of growth and viability ». *Future Medicinal Chemistry* 9 (3): 267-69. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0227>.
- Trantidou Tatiana, Dekker Linda, Polizzi Karen, Ces Oscar, et Elani Yuval. 2018. « Functionalizing cell-mimetic giant vesicles with encapsulated bacterial biosensors ». *Interface Focus* 8 (5): 20180024. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2018.0024>.
- Tsai, Feng-Ching, Björn Stuhmann, et Gijse H. Koenderink. 2011. « Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 27 (16): 10061-71. <https://doi.org/10.1021/la201604z>.
- Tsumoto, Kanta, Hideki Matsuo, Masahiro Tomita, et Tetsuro Yoshimura. 2009. « Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with

- sugar ». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 68 (1): 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.09.023>.
- Turner, L., W. S. Ryu, et H. C. Berg. 2000. « Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments ». *Journal of Bacteriology* 182 (10): 2793-2801.
- Turner, Linda, Alan S. Stern, et Howard C. Berg. 2012. « Growth of flagellar filaments of *Escherichia coli* is independent of filament length ». *Journal of Bacteriology* 194 (10): 2437-42. <https://doi.org/10.1128/JB.06735-11>.
- Ueno, T., K. Oosawa, et S. Aizawa. 1992. « M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella Typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF ». *Journal of Molecular Biology* 227 (3): 672-77.
- Ulmer, Candice Z., Rainey E. Patterson, Jeremy P. Koelmel, Timothy J. Garrett, et Richard A. Yost. 2017. « A robust lipidomics workflow for mammalian cells, plasma, and tissue using liquid-chromatography high-resolution tandem mass spectrometry ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1609: 91-106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6996-8_10.
- Ushiyama, Akira, Hanae Kataoka, et Takehiko Iijima. 2016. « Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiology ». *Journal of Intensive Care* 4 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0182-z>.
- Väisänen, Vuokko, LeifG. Tallgren, P. Helena Mäkelä, Gunilla Källenius, Hans Hultberg, Jaakko Elo, Anja Siitonen, Catharina Svanborg-Edén, StefanB. Svenson, et Timo Korhonen. 1981. « Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis ». *The Lancet* 318 (8260-8261): 1366-69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)92796-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)92796-3).
- Van Gerven, Nani, Sander E. Van der Verren, Dirk M. Reiter, et Han Remaut. 2018. « The role of functional amyloids in bacterial virulence ». *Journal of Molecular Biology* 430 (20): 3657-84. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.010>.
- Van Way, Susan M., Stephanos G. Millas, Aaron H. Lee, et Michael D. Manson. 2004. « Rusty, jammed, and well-oiled hinges: mutations affecting the interdomain region of FliG, a rotor element of the *Escherichia coli* flagellar motor ». *Journal of Bacteriology* 186 (10): 3173-81.
- Vance, Jean E. 2015. « Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1111/tra.12230>.
- Vartanian, Armand S., Aviv Paz, Emily A. Fortgang, Jeff Abramson, et Frederick W. Dahlquist. 2012. « Structure of flagellar motor proteins in complex allows for insights into motor structure and switching ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (43): 35779-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.378380>.
- Veatch, Sarah L., et Sarah L. Keller. 2003a. « A closer look at the canonical 'Raft mixture' in model membrane studies ». *Biophysical Journal* 84 (1): 725-26.
- . 2003b. « Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol ». *Biophysical Journal* 85 (5): 3074-83.
- Vigeant, Margot A.-S., Roseanne M. Ford, Michael Wagner, et Lukas K. Tamm. 2002. « Reversible and irreversible adhesion of motile *Escherichia coli* cells analyzed by total internal reflection aqueous fluorescence microscopy ». *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6): 2794-2801. <https://doi.org/10.1128/aem.68.6.2794-2801.2002>.
- Vonderviszt, F., S. Aizawa, et K. Namba. 1991. « Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability ». *Journal of Molecular Biology* 221 (4): 1461-74.

- Vonderviszt, F., K. Imada, Y. Furukawa, H. Uedaira, H. Taniguchi, et K. Namba. 1998. « Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2 ». *Journal of Molecular Biology* 284 (5): 1399-1416. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2274>.
- Voxeur, Aline, et Stephen C. Fry. 2014. « Glycosylinositol phosphorylceramides from *Rosa* cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II ». *The Plant Journal* 79 (1): 139-49. <https://doi.org/10.1111/tpj.12547>.
- Wagner, C.E., K.M. Wheeler, et K. Ribbeck. 2018. « Mucins and their role in shaping the functions of mucus barriers ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (1): 189-215. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062818>.
- Walde, Peter, Katia Cosentino, Helen Engel, et Pasquale Stano. 2010. « Giant vesicles: preparations and applications ». *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 11 (7): 848-65. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000010>.
- Wang, Jianfeng, Hongen Li, Juan Pan, Jing Dong, Xuan Zhou, Xiaodi Niu, et Xuming Deng. 2018. « Oligopeptide targeting sortase A as potential anti-infective therapy for *Staphylococcus aureus* ». *Frontiers in Microbiology* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00245>.
- Wang, Mingxun, Jeremy J. Carver, Vanessa V. Phelan, Laura M. Sanchez, Neha Garg, Yao Peng, Don Duy Nguyen, et al. 2016. « Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking ». *Nature Biotechnology* 34 (8): 828-37. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- Wang, Xiaogang, Xiaofei Gao, et Philip R. Hardwidge. 2012. « Heat-labile enterotoxin-induced activation of NF- κ B and MAPK pathways in intestinal epithelial cells impacts enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adherence ». *Cellular Microbiology* 14 (8): 1231-41. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01793.x>.
- Ward, Elizabeth, Thibaud T. Renault, Eun A. Kim, Marc Erhardt, Kelly T. Hughes, et David F. Blair. 2018. « Type-III secretion pore formed by flagellar protein FlpP ». *Molecular Microbiology* 107 (1): 94-103. <https://doi.org/10.1111/mmi.13870>.
- Weinberger, Andreas, Feng-Ching Tsai, Gijssje H. Koenderink, Thais F. Schmidt, Rosângela Itri, Wolfgang Meier, Tatiana Schmatko, André Schröder, et Carlos Marques. 2013. « Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles ». *Biophysical Journal* 105 (1): 154-64. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.024>.
- Weiss, Marian, Johannes Patrick Frohnmayer, Lucia Theresa Benk, Barbara Haller, Jan-Willi Janiesch, Thomas Heitkamp, Michael Börsch, et al. 2018. « Sequential bottom-up assembly of mechanically stabilized synthetic cells by microfluidics ». *Nature Materials* 17 (1): 89-96. <https://doi.org/10.1038/nmat5005>.
- Wellens, Adinda, Martina Lahmann, Mohamed Touaibia, Jonathan Vaucher, Stefan Oscarson, René Roy, Han Remaut, et Julie Bouckaert. 2012. « The tyrosine gate as a potential entropic lever in the receptor-binding site of the bacterial adhesin FimH ». *Biochemistry* 51 (24): 4790-99. <https://doi.org/10.1021/bi300251r>.
- Werneburg, Glenn T., et David G. Thanassi. 2018. « Pili assembled by the Chaperone/Usher pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella* ». *EcoSal Plus* 8 (1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2017>.
- Winnen, Brit, Markus C. Schlumberger, Alexander Sturm, Kaspar Schüpbach, Stefan Siebenmann, Patrick Jenny, et Wolf-Dietrich Hardt. 2008. « Hierarchical effector protein transport by the

- Salmonella* Typhimurium SPI-1 type III secretion system ». *PLoS One* 3 (5): e2178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002178>.
- Witkowska, Agata, Lukasz Jablonski, et Reinhard Jahn. 2018. « A convenient protocol for generating giant unilamellar vesicles containing SNARE proteins using electroformation ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27456-4>.
- Wolfgang, Matthew, Jos P.M. van Putten, Stanley F. Hayes, David Dorward, et Michael Koomey. 2000. « Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili ». *The EMBO Journal* 19 (23): 6408-18. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6408>.
- Worstell, Nolan C., Akshi Singla, Panatda Saenkham, Thushara Galbadage, Preeti Sule, Dongheon Lee, Alec Mohr, Joseph Sang-Il Kwon, Jeffrey D. Cirillo, et Hung-Jen Wu. 2018. « Heteromultivalency of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA binding to model membranes ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26643-7>.
- Xing, Qiong, Ke Shi, Athina Portaliou, Paolo Rossi, Anastassios Economou, et Charalampos G. Kalodimos. 2018. « Structures of chaperone-substrate complexes docked onto the export gate in a type III secretion system ». *Nature Communications* 9 (1): 1773. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04137-4>.
- Xu, Shengjuan, Zhong Peng, Boyu Cui, Tietao Wang, Yunhong Song, Lei Zhang, Gehong Wei, Yao Wang, et Xihui Shen. 2014. « FliS modulates FlgM activity by acting as a non-canonical chaperone to control late flagellar gene expression, motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis* ». *Environmental Microbiology* 16 (4): 1090-1104. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12222>.
- Yamamoto, Shouji, et Kazuhiro Kutsukake. 2006. « FliT acts as an anti-FlhD₂C₂ factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 188 (18): 6703-8. <https://doi.org/10.1128/JB.00799-06>.
- Yamashita, I., K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue, et K. Namba. 1998. « Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction ». *Nature Structural Biology* 5 (2): 125-32.
- Yamashita, Yuko, Masato Oka, Tomoki Tanaka, et Masahito Yamazaki. 2002. « A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1561 (2): 129-34. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00338-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00338-3).
- Yang, Sung-Tae, Volker Kiessling, et Lukas K. Tamm. 2016. « Line tension at lipid phase boundaries as driving force for HIV fusion peptide-mediated fusion ». *Nature Communications* 7 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11401>.
- Yang, Sung-Tae, Alex J. B. Kreutzberger, Volker Kiessling, Barbie K. Ganser-Pornillos, Judith M. White, et Lukas K. Tamm. 2017. « HIV virions sense plasma membrane heterogeneity for cell entry ». *Science Advances* 3 (6): e1700338. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700338>.
- Yewdall N. Amy, Mason Alexander F., et van Hest Jan C. M. 2018. « The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells ». *Interface Focus* 8 (5): 20180023. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2018.0023>.
- Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, et K. Namba. 2000. « The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5499): 2148-52.

- Yonekura, Koji, Saori Maki-Yonekura, et Keiichi Namba. 2003. « Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy ». *Nature* 424 (6949): 643-50. <https://doi.org/10.1038/nature01830>.
- Young, G. M., D. H. Schmiel, et V. L. Miller. 1999. « A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 6456-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6456>.
- Yuan, Junhua, Richard W. Branch, Basarab G. Hosu, et Howard C. Berg. 2012. « Adaptation at the output of the chemotaxis signalling pathway ». *Nature* 484 (7393): 233-36. <https://doi.org/10.1038/nature10964>.
- Zagorodko, Oleksandr, Julie Bouckaert, Tetiana Dumych, Rostyslav Bilyy, Iban Larroulet, Aritz Yanguas Serrano, Dimitri Alvarez Dorta, et al. 2015. « Surface Plasmon Resonance (SPR) for the evaluation of shear-force-dependent bacterial adhesion ». *Biosensors* 5 (2): 276-87. <https://doi.org/10.3390/bios5020276>.
- Zaloba, Patryk, Ben A. Bailey-Elkin, Miriam Derksen, et Brian L. Mark. 2016. « Structural and biochemical insights into the peptidoglycan hydrolase domain of FlgJ from *Salmonella* Typhimurium ». *PloS One* 11 (2): e0149204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149204>.
- Zav'yalov, Vladimir, Anton Zavialov, Galina Zav'yalova, et Timo Korpela. 2010. « Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical Chaperone/Usher machinery: structure and function from a clinical standpoint ». *FEMS Microbiology Reviews* 34 (3): 317-78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x>.
- Zhao, Wei, Tomasz Róg, Andrey A. Gurtovenko, Ilpo Vattulainen, et Mikko Karttunen. 2007. « Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol lipid bilayers with Na⁺ counterions ». *Biophysical Journal* 92 (4): 1114-24. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.086272>.
- Zhao, Xiaowei, Kai Zhang, Tristan Boquoi, Bo Hu, M. A. Motaleb, Kelly A. Miller, Milinda E. James, et al. 2013. « Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (35): 14390-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308306110>.
- Zhao, Ziyi, Yifan Zhao, Xiang-Yu Zhuang, Wei-Chang Lo, Matthew A. B. Baker, Chien-Jung Lo, et Fan Bai. 2018. « Frequent pauses in *Escherichia coli* flagella elongation revealed by single cell real-time fluorescence imaging ». *Nature Communications* 9 (1): 1885. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04288-4>.
- Zhou, J., S. A. Lloyd, et D. F. Blair. 1998. « Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6436-41.
- Zhou, Yong, Christina K. Berry, Patrick A. Storer, et Robert M. Raphael. 2007. « Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation ». *Biomaterials* 28 (6): 1298-1306. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.016>.
- Zhu, Shiwei, Masato Takao, Na Li, Mayuko Sakuma, Yuuki Nishino, Michio Homma, Seiji Kojima, et Katsumi Imada. 2014. « Conformational change in the periplasmic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (37): 13523-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324201111>.

Publications scientifiques
issues de cette thèse

Bacterial Adherence to Plant and Animal Surfaces Via Adhesin-Lipid Interactions

Claire Rossi, Hélène Cazzola, Nicola J. Holden, and Yannick Rossez

Contents

1	Introduction	2
2	Bacterial Adhesion	2
2.1	Fimbriae	3
2.2	Bacterial Flagella	4
2.3	Other Adhesins and Bacterial Toxins	5
3	Bacterial Translocons and Effectors	6
3.1	T3SS	6
3.2	T4SS	8
3.3	T6SS	9
4	Biomimetic Membrane Models	9
4.1	Liposomes and Bacterial Interaction	10
4.2	Liposomes as Tools for Biosensing	11
4.3	Bacterial Toxin Interaction with Tethered Bilayer Models	12
4.4	Whole-Bacteria Interaction with Membrane Models	14
5	Research Needs	14
	References	15

Abstract

The plasma membrane acts as one of the first lines of defense by establishing a physical barrier against microbes. Nevertheless, bacteria have developed a range of strategies to invade the host tissues efficiently. In this chapter, we focus on this understudied area and describe how bacteria target or redirect host membrane

C. Rossi · H. Cazzola · Y. Rossez (✉)

UMR7025 CNRS Enzyme and Cell Engineering Laboratory, Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France

e-mail: Claire.Rossi@utc.fr; Helene.Cazzola@utc.fr; Yannick.Rossez@utc.fr

N. J. Holden

Cellular and Molecular Sciences, James Hutton Institute, Dundee, Scotland, UK

e-mail: Nicola.Holden@hutton.ac.uk

  Springer Nature Switzerland AG 2019

1

H. Goldfine (ed.), *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology,

https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_13-1

lipids. Domains enriched in sterols and sphingolipids, denominated membrane rafts, in particular, have been reported to be exploited by numerous bacterial pathogens. We will first describe the different strategies employed by bacteria to specifically target the PM via membrane rafts and non-raft counterpart domains; and secondly, we illustrate how development of biomimetic membranes has identified bacterial mechanisms of interaction.

1 Introduction

The cellular membrane is responsible for cell compartmentalization that coordinates the transport of molecules, cell signaling, or pathogen recognition. Most of these mechanisms are dependent on intricate interactions between proteins and lipids. The most abundant lipids are glycerolipids, sphingolipids, and sterols in animals and plants. Glycerolipids and sphingolipids are categorized into different lipid classes based on the chemical structures of their head groups and each class varies in its fatty acid content due to the degree of unsaturation, chain length, and linkage (Harayama and Riezman 2018). To add to this complexity, these molecules are not homogeneously distributed across membranes, resulting in a spatial organization of the lipid landscape of the cell plasma membrane (PM). Sphingolipids have a specific physical location within plant and animal membranes. They are mainly located in the outer leaflet of the PM, whereas the glycerophospholipids like phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylethanolamine (PE) occur mainly in the inner leaflet (van Meer and de Kroon 2011; Cacas et al. 2016). Pathogenic bacteria can overcome and even exploit this diversity and complex organization by directly binding interactions to different lipid classes from different cell-surface expressed appendages.

2 Bacterial Adhesion

Bacteria adhere to many surfaces for successful colonization of hosts and as a survival mechanism in the environment. Macromolecules exposed on the bacterial surface involved in adhesion are referred to as adhesins: a generic designation describing various extracellular structures, ranging from outer membrane proteins to a variety of monomeric or polymeric proteinaceous surface appendages (Kline et al. 2009). The best-studied cell appendages, exclusively found in Gram-negative bacteria, are the chaperone-usher fimbriae (also known as pili). Adhesins typically recognize specific targets thus enabling the bacterium to bind on a specific surface, which results in tropism towards particular tissue types. Many different types of fimbriae have been described but the prototypical fimbriae are Type 1 (Ofek et al. 1977) in *Escherichia coli* and P fimbriae found in uropathogenic *E. coli* (UPEC) (Dodson et al. 2001) which mediate binding to specific receptors enriched in the bladder and upper urinary tract, respectively. Over the years, a large number of

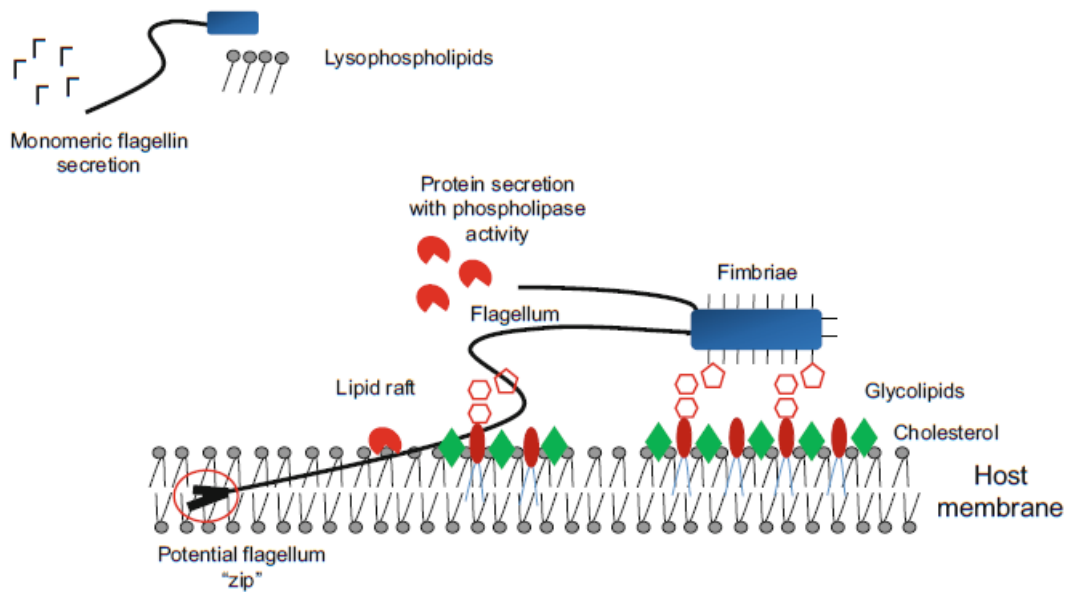


Fig. 1 Bacterial adhesion on host plasma membrane

adhesive proteins have been identified and, for some of them, their affinity for PM lipidic molecules (Fig. 1).

2.1 Fimbriae

Fimbriae are adhesive hair-like organelles expressed on the surface of bacteria, generally with an adhesin at the tip (Pizarro-Cerdá and Cossart 2006). They are exported to the bacterial surface by either a chaperone-usher set of proteins (Costa et al. 2015) or by a type IV or type V pili secretion (T4p or T5p) apparatus consisting each of several proteins (Hospenthal et al. 2017). Although bundle-forming pilus (BPF) of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) has been shown to bind directly to PE (Khursigara et al. 2001), most fimbriae have a lectinic adhesin that binds a carbohydrate component of glycolipids. For example, the PapG adhesin of pyelonephritis-associated (P) pilus binds to α -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-galactopyranoside from a type of glycosphingolipid termed globoside, enriched in upper urinary tract cells (Väisänen et al. 1981; Dodson et al. 2001). Several other bacterial species like *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* have been identified to bind specifically to this carbohydrate harbored by glycosphingolipids ganglioside, fucosylasialo-GM1, asialoGM1, and asialo-GM2 (Krivan et al. 1988). Interestingly, candidate adhesins involved in glycosphingolipid recognition have not yet been identified for these species, implicating potentially uncharacterized fimbriae gene clusters. Until recently, *P. aeruginosa* T4p was described to bind the GalNAc β 1-4Gal moiety of the asialo-GM1 and asialo-GM2 via the adhesin PilA (Lee et al. 1994). However, the interaction was shown to be context dependent since

binding to glycosphingolipids only occurred with sheared T4p organelles, and not when they are expressed from the *P. aeruginosa* bacterial surface (Emam et al. 2006). S-fimbriae found in *E. coli* adheres to galactosyl ceramide, lactosyl ceramide, and sulphated galactocerebroside (or sulphatide) via the SfaA adhesin protein (Prasadarao et al. 1993). Sulphatide can be found on different type of animal tissues and was first isolated from human brain meningeal tissue (Eckhardt 2008), hence these bacteria are often associated with meningitis (Parkkinen et al. 1988). The lipid plays a role in bacterial adhesion for a number of bacterial species like *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, and *Campylobacter jejuni* (Takahashi and Suzuki 2012). For transmembrane glycoproteins, their surrounding lipidic environment is indirectly involved for adhesion and invasion of target cells. FimH encoded by Type 1 fimbriae binds to mannosylated proteins in the urinary tract and needs lipid rafts for *E. coli* penetration of bladder epithelium (Duncan et al. 2004). In contrast, binding some FimH variants to plant tissue occurs via recognition of hemicellulosic β -(1–4) mannans or *N*-linked glycoproteins in plant cell walls (Marshall et al. 2016).

2.2 Bacterial Flagella

The flagellum is a major organelle present in the majority of bacterial species. This self-assembly protein machinery is mostly used for motility and chemotaxis (Evans et al. 2014). Flagellin, a globular protein forming the flagellum, is recognized by specialized host cell surface receptors such as Toll-like receptor 5 (TLR5) in animals or FLS2 in plants, and because of its virtual ubiquity in bacteria, it is a potent immunogen. Microbe perception occurs on flagellin binding to these receptors, triggering innate immunity activation (Rossez et al. 2015). However, the flagellum has also been identified as an adhesin. Flagella are capable of binding different surfaces including lipids, aided in reaching PM by their length (Rossez et al. 2015). Flagella from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium have been shown to have an affinity for cholesterol from studies using cholesterol-coated surfaces. This surprising finding required verification that fimbrial adhesins, such as type 1 fimbriae, were not involved (Crawford et al. 2010). Different *E. coli* flagella serotypes have been demonstrated to bind negatively charged membrane lipids (phospholipids and sulpholipids) *in planta* (Rossez et al. 2014), where it is thought that the length and flagellar rotation help to penetrate the plant cell wall to the underlying PM. *P. aeruginosa* flagellum preferentially adheres on the gangliosides GM1 and aGM1. However, binding is thought to occur as an early step in adhesion before fimbriae adhesion (Feldman et al. 1998), which was supported by the finding that flagellar adhesion to ganglioside is a major factor for TLR activation (Adamo et al. 2004). Cellular stress-induced changes have been shown to influence pathogen interactions with epithelial cells, where stress (e.g., oxidative stress) activates acid sphingomyelinase, which induces PM remodeling, and prevents non-motile bacterial *Shigella flexneri* binding to the cells. In contrast, flagellated bacteria (*S. enterica*) can overcome this lipid remodeling process by accumulating at the remaining

sphingolipid rich domains (Tawk et al. 2018). Hydrophobicity has also been shown to play a role in how bacterial flagella adhere, such that flagella can bind loosely to hydrophilic surfaces, whereas on hydrophobic surfaces, initial attachment is loose but increases progressively. This occurs apparently through conformational changes to the flagella, which may “zip” onto the surface and form stronger bonds with the hydrophobic surface (Friedlander et al. 2015). This work gives some insight on how bacterial flagella could interact with PM but needs to be tempered by the fact that PM are charged and composed by amphiphilic molecules.

Host lipids are not only used by bacteria to adhere on PM but can also serve to indicate the presence of the host cell to the pathogen via intermediate phospholipids like lysophospholipids. For example, in a form of host innate immunity regulation, secretion of *S. enterica* monomeric flagellin is induced by host-produced lysophospholipids to allow pathogen sensing, since only monomeric and polymerized flagellin trigger immune response via TLR-5 binding (Subramanian and Qadri 2006). For some species, secretion of non-flagellin proteins occurs via the flagella apparatus, similar to that of the non-flagellar type three-secretion system (T3SS). For example, in *Yersinia enterocolitica*, YplA, a non-flagellar protein has been shown to be secreted by the flagellar type III secretion system and is associated with a phospholipase activity (Schmiel et al. 1998; Young et al. 1999). In *Campylobacter jejuni*, which lacks non-flagellar T3SS, flagella-mediated secretion has been demonstrated for FlaC, an adhesin that facilitates binding to human cells (Song et al. 2004). This flagellin-like protein is secreted in order to specifically modulate host responses via TLR5 activation (Faber et al. 2016).

2.3 Other Adhesins and Bacterial Toxins

Besides appendages on bacterial surface, some outer membrane proteins can mediate adhesion to host surfaces. The outer membrane protein MAM7 (multivalent adhesion molecule) present in several Gram-negative bacteria has been shown to bind to fibronectin and phosphatidic acid (PA). Their adhesion can occur concurrently, although PA is fundamental to obtain a stable binding to the host and a basic residue (mce2 Lys-166) seems to be essential (Krachler et al. 2011). The rickettsial Outer-membrane protein B (rOmpB) from the obligate intracellular tick-borne pathogen *Rickettsia conorii* facilitates both binding to and invasion of non-phagocytic mammalian cells, requiring complex regulation between several partners for internalization. rOmpB targets a 70 kDa protein, Ku70, found at the host PM and in association with cholesterol-enriched lipid rafts. For internalization, three other proteins are needed: E3 ubiquitin ligase (c-Cbl), clathrin, and caveolin-2 (Martinez et al. 2005; Chan et al. 2009).

There are significant evidences showing bacterial toxins bind to membrane lipid to form pores. Some toxins target specifically membrane lipid raft to penetrate the cell. The best described is the cholera toxin B-subunit (CTxB), the membrane-binding subunit of cholera toxin, which is used as a marker of lipid raft (Day and Kenworthy 2015). This toxin secreted by *Vibrio cholera* has two subunits: The

CTxA with an enzymatic activity to G protein which activates adenylate cyclase and a homopentameric CTxB which binds to GM1 gangliosides (van Heyningen 1974). For complete reviews on bacterial toxins and pore formation see Geny and Popoff (2006); Tilley and Saibil (2006); Los et al. (2013).

3 Bacterial Translocons and Effectors

To successfully colonize host tissues, many bacterial pathogens have evolved multiple protein secretion systems. Bacteria use 12 distinct classes of protein secretion systems to export proteins through their multilayered cell envelope (Green and Mecsas 2016). Some of the secretion systems can translocate proteins, termed bacterial effectors, into host cells, which in some cases target PM lipids (Geissler 2012). For this, they need to target host PM to form a pore or to go through after structural contraction (Fig. 2). Of the systems described above that directly interact with host lipids, flagella are ancestrally related to the Type 3 secretion system (T3SS); and OMP are exported via Type 1 secretion systems (T1SS) (Costa et al. 2015). The T3SS, type IV secretion system (T4SS) and type VI secretion system (T6SS), found mainly in Gram-negative bacteria, interact directly with and/or cross the host PM (Costa et al. 2015).

3.1 T3SS

The type 3 secretion system (T3SS) is used by both plant and animal pathogens to deliver effector proteins into host cells, via a molecular syringe, to promote host interactions, pathogenic, beneficial, or commensal. The T3SS needle complex encoded by animal pathogens is shorter than that of plant pathogens, with a length of 20–40 nm whereas more than 100 nm is required to penetrate the thick plant cell wall (CW) (Ji and Dong 2015). The morphological and protein subunit similarities between the T3SS and the bacterial flagellar system components indicate that these systems are homologs, arising from a common evolutionary origin (Macnab 1999; Pallen and Gophna 2007). The flagellar apparatus is thought to be the evolutionary precursor of T3SS, which has diversified over a series of gene duplications, losses, and acquisitions and has evolved the ability to deliver effectors to eukaryotic cells (Nguyen et al. 2000; Saier 2004; Abby and Rocha 2012). To inject T3SS effectors, a pore-forming multi-protein organelle, termed a translocon is inserted into host PM upon contact with host cell. Three types of protein translocons allow delivery of effectors: two are hydrophobic and one hydrophilic. The hydrophobic translocators are subdivided in two categories, one with only one transmembrane (TM) domain and the other with two TM domains. Due to their TM domains, these proteins insert in the host PM to form the translocon. The hydrophilic protein connects the membrane-inserted translocon and the tip of the T3SS needle (Matteï et al. 2011; Deng et al. 2017). In animal cells, the pore formation process requires transmembrane protein CCR5 (chemokine [C-C motif] receptor 5) in order to modulate

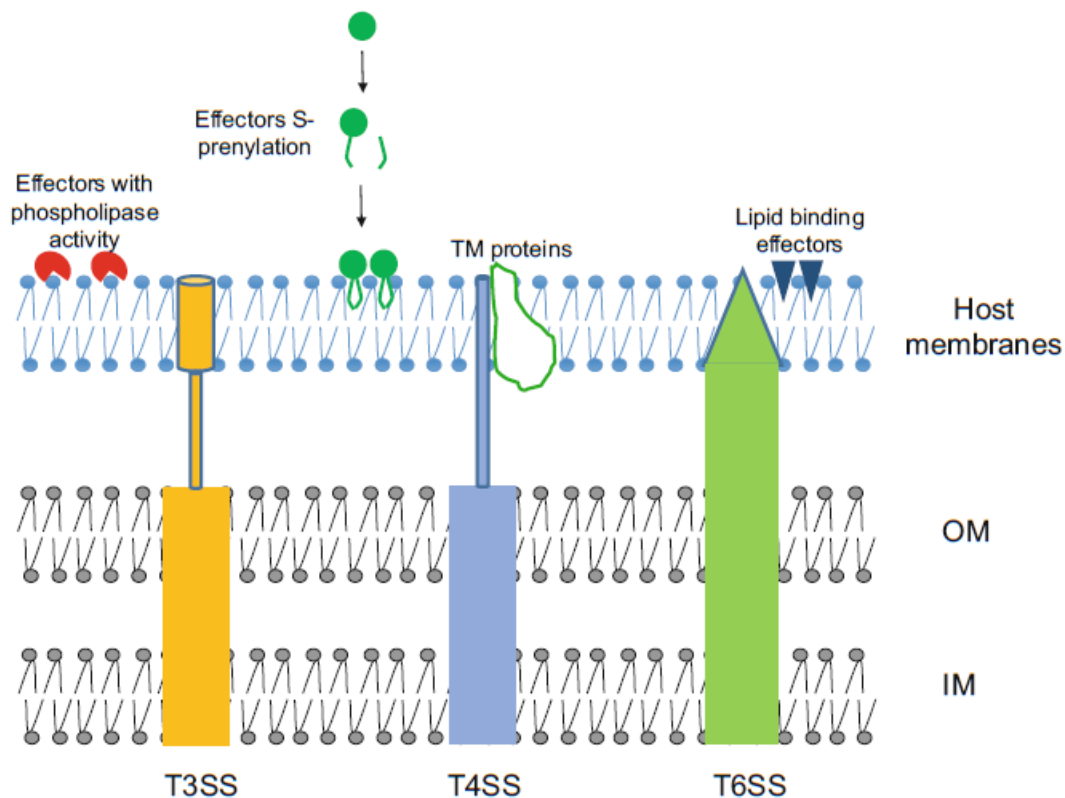


Fig. 2 Secretion systems, plasma membrane, and effectors

cytoskeletal activities and allow hydrophobic translocon assembly (Sheahan and Isberg 2015). In plants, T3SS accessories proteins are needed to degrade the CW and facilitate access for translocon to PM (Charkowski et al. 1998; Kim and Beer 1998). IpaB, in *Shigella*, is one TM domain protein located on the tip of T3SS and binds to the hyaluronan receptor CD44. This interaction is impacted by depletion of cholesterol or sphingolipids from the epithelial cell PM (Lafont 2002; Van Der Goot et al. 2004). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) secrete their own receptor via the T3SS, the translocated intimin receptor (Tir). PM embedded Tir then binds to the EPEC adhesin intimin and induces intimate attachment between the bacterial and host cells (Hartland et al. 1999).

T3SS effectors can target host PM directly by degrading phospholipids like PI, to facilitate host manipulation or colonization. PI lipids are implicated in a multitude of role from actin cytoskeleton arrangements to vesicle trafficking and are the target of pathogenic bacteria; see Hilbi (2006) for review. An effector from *Shigella flexneri*, the inositol phosphate phosphatase IpgD, hydrolyzes phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to produce phosphatidylinositol 5-monophosphate (PI5P). This leads to actin reorganization promoting bacteria entry (Konradt et al. 2011). Others effectors from a number of bacteria (Ham et al. 2011) such as *Mycobacterium tuberculosis* (Beresford et al. 2007), *S. enterica* (Norris et al. 1998; Marcus et al. 2001), and *V. parahaemolyticus* (Broberg et al. 2010) are known to manipulate host membranes in comparable ways.

Effectors from intracellular pathogens like *S. enterica* can modify phagosomes' membranes to prevent fusion with host lysosomes and then to replicate inside host cells. For example, SifA contains Cys-aliphatic-aliphatic-X (CAAX) motif in its last C-terminal residues. When translocated, this motif is isoprenylated and S-acylated by eukaryotic cells. S-prenylation covalently adds isoprene groups, mainly farnesyl (15-carbon) and geranylgeranyl (20-carbon), to cysteine residues. These modifications increase the effector hydrophobicity and anchors them at the membrane (Boucrot et al. 2003; Reinicke et al. 2005).

3.2 T4SS

Like the T3SS, the type 4 secretion system (T4SS) can also reach host PM to transfer material proteins into the cytoplasm of eukaryotic cells and bacteria, although this includes DNA as well as proteins. The prototypical T4SS is from the phytopathogen, *Agrobacterium tumefaciens* (Grohmann et al. 2018). This bacterium uses the T4SS to transfer oncogenic T-DNA and different effectors to plant cells in order to induce crown gall disease (Salmond 1994). The T4SSs of Gram-negative bacteria appears to have evolved through consolidation of four functionally distinct structures. A hexameric ATPase, implicated in DNA/protein coupling and denominated type IV coupling protein (T4CP). Two membrane complexes needed for substrate passage across inner membrane or periplasm and outer membrane. They are named inner membrane complex (IMC) and outer membrane complex (OMC), respectively. The conjugative pilus is an example of the OMC and directly initiates contact with the host cell PM (Christie et al. 2014). Three proteins represent the pilus-assembly components: a transglycosylase (VirB1), a pilin (VirB2), and a pilus-tip (VirB5). To date, only VirB2 and VirB5 have been shown to be responsible for T4SS pilus adhesion on plant cells. Three related plant proteins with putative transmembrane domains, VirB2-interacting protein (BTI)-1, BTI2, and BTI3 were identified together with a membrane-associated GTPase, AtRAB8 to interact with VirB2 (Hwang and Gelvin 2004). Likewise, VirB5 has been described to target the transzeatin biosynthetic protein (Tzs) exposed to the plant cell surface (Aly et al. 2008). The human/animal pathogens, the best described T4SS is for *Helicobacter pylori*. The *H. pylori* VirB5 ortholog CagL, which was the first formally recognized bacterial carcinogen, binds specifically to a TM receptor, integrin $\alpha 5 \beta 1$ (Kwok et al. 2007). The *H. pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) interacts with PS on the host PM to promote CagA internalization (Murata-Kamiya et al. 2010). Specific host transmembrane proteins act as receptors for the *H. pylori* outer membrane protein HopQ. These proteins, called carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs), facilitate CagA translocation (Zhao et al. 2018). When translocated, CagA dysregulates the homeostatic signal transduction of gastric epithelial cells by shifting cell behavior. Similar to the T3SS effector SifA in *S. enterica*, the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila* T4SS effectors, AnkB when translocated in to the host are prenylated (Price et al. 2010). To replicate *L. pneumophila* needs to be intracellularly in an ER-associated compartment, the *Legionella*-

containing vacuole (LCV). Approximately 300 effector proteins are translocated; some of the effectors anchor to membrane through PI4P or PI3P to promote the interaction of LCVs with host vesicles and organelles, to affect small GTPases or PI-metabolizing enzymes see Steiner et al. (2018) for review.

3.3 T6SS

This versatile nanomachine was first described in 2006 in *P. aeruginosa* (Mougous et al. 2006). It delivers a wide arsenal of effector proteins directly into prokaryotic and eukaryotic target cells. T6SS share a bacteriophage-related tail structure anchored to the cell envelope by a membrane complex (Cherrak et al. 2000; Leiman et al. 2009). The T6SS tail tube is a structure made of different protein subunits that polymerize to form the contractile sheath. This tube wraps around the hemolysin co-regulated protein (Hcp) and dynamically propels a spike at its tip. This puncturing device is formed by Hcp and valine–glycine repeat protein G (VgrG). Then T6SS effectors are injected across bacterial membranes during this contraction mechanism (Basler et al. 2012). Effectors propelled by T6SS can affect host PM. In *B. thailandensis*, Vgrg-5 induce membrane fusion, either by the recruitment of other factors or by direct participation (Schwarz et al. 2014). In *Vibrio cholerae*, VasX is a secreted, lipid-binding protein, which can disrupt bacterial and host cell signaling. This T6SS protein can both kill and protect bacterial cells (Miyata et al. 2011, 2013). Anti-bacterial T6SS effectors target bacterial membrane with phospholipase activity in *P. aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis*, or entero-aggregative *E. coli* (Russell et al. 2013; Flaughnatti et al. 2016).

4 Biomimetic Membrane Models

Here we describe application of biomimetic models as tools for the detection and characterization of bacterial proteins or whole bacteria interactions with host cell membranes. Membrane-based biomimetic systems have been developed to reconstitute and investigate biological events occurring at the cell membrane interface under controlled conditions. The complexity of the biological membranes makes direct investigation of their interaction with bacterial cells or compounds at the molecular level very challenging. In an attempt to overcome the limitations, lipid bilayer systems have been introduced as models of biological membranes. These models have been successfully used to study the interaction and the insertion of peptides, proteins, or whole organisms.

The simplest and most commonly used biomimetic models are vesicles and liposomes. These spherical lipid bilayers form an internal aqueous cavity and are classified according to their diameters into: Small Unilamellar Vesicles (SUV), which exhibit a mean diameter inferior to 100 nm; Large Unilamellar Vesicles (LUV) have a diameter between 100 and 1000 nm; whereas Giant Unilamellar Vesicles (GUV) have a size range of 1–200 μm of diameter. Due to their size,

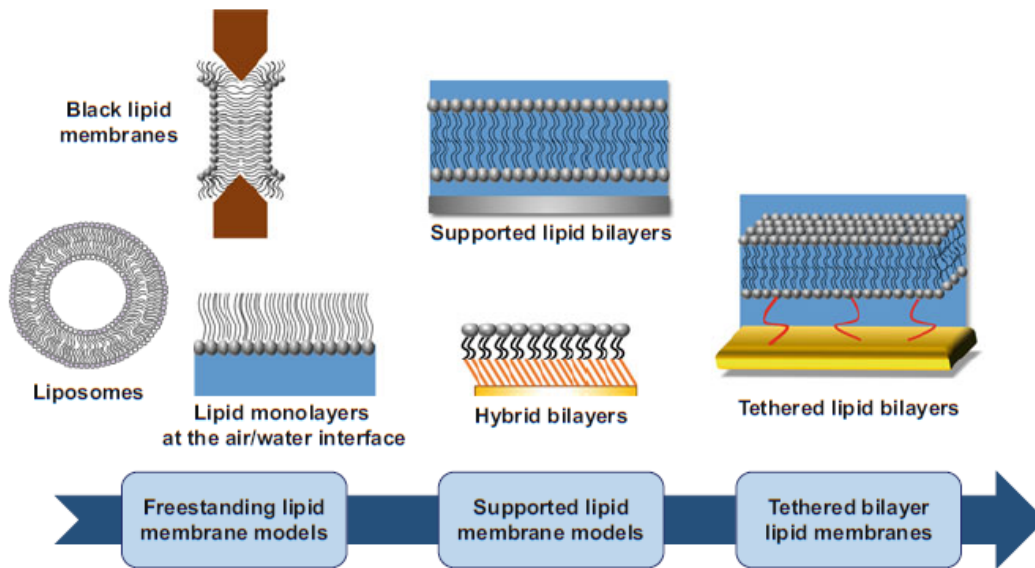


Fig. 3 Evolution of the lipid bilayer model architectures over time

GUVs are recognized as the best membrane model for mimicking the cell membrane curvature since animal and plant cells have a size ranging from 10 to 30 μm and from 10 to 100 μm , respectively.

A variety of biomimetic membrane systems on solid support have been developed and coupled to surface sensitive techniques such as Surface Plasmon Resonance (SPR), Atomic Force Microscopy (AFM), quartz crystal microbalance, or neutron-reflectometry. Among all the existing models, solid supported membranes provide higher stability than freestanding lipid models (Fig. 3). In 1984, Brian et al. pioneered a simplified method for the construction of supported planar membranes to study biological mechanisms (Brian and McConnell 1984). After this work, a variety of constructions on solid surface were developed including supported lipid bilayers (SLB) directly reconstituted on hydrophilic surfaces and tethered bilayers (tBLM) (Rebaud et al. 2014; Veneziano et al. 2017). Tethered bilayer lipid membranes were designed to overcome the limitations of SLB. They comprise a lipid bilayer spaced out from solid support by the use of molecular spacers or layers that intercalate between the substrate and the bilayer. This enables to study the incorporation or translocation of proteins without interference with the support (Tanaka and Sackmann 2005; Rossi and Chopineau 2007).

4.1 Liposomes and Bacterial Interaction

Liposomes are the simplest model system that mimic cell membranes. They offer the advantage of being very versatile as their lipid composition can be easily tailored to the question. They have been used to characterize the mode of interaction of bacteria with cell membranes and define the functional roles of the host cell membrane and bacterial components. LUVs were used in demonstration of the role of glycan-

glycan interactions during the initial binding of *Shigella dysenteriae* to host cells. Outer membrane vesicles (OMV) containing lipopolysaccharide (LPS) were shown to be spontaneously, secreted by *S. dysenteriae*. In order to characterize the interaction of the O-antigen polysaccharide moiety of LPS, LUV with or without ganglioside GM1 were incubated with the OMVs and showed that the glycosylated part of GM1 from the host PM cells associated directly to the LPS. This phenomenon is involved in *S. dysenteriae* binding to host CD4⁺ T lymphocytes (Belotserkovsky et al. 2018).

Likewise, GUVs were used to implicate globotriaosylceramide Gb3-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa*. The authors coined this mechanism “lipid zipper” where the galactophilic lectin (LecA) present in the bacterial outer membrane binds the carbohydrate moiety of Gb3 to mediate the entry of the bacteria. Microscopy analysis showed that the bacterial interaction with GUVs composed of DOPC/Chol/Gb3 was strictly driven by the lectin-Gb3 interaction and lead to the reorganization of membrane lipids into clusters with a negative membrane curvature that accompany the bacterial entry into GUVs (Eierhoff et al. 2014).

The importance of the nature of lipids involved in the bacteria/host cell membrane interaction can also be investigated with such biomimetic systems. Recently, it was shown by co-floitation assays that the signal peptide of the serine-rich repeat adhesin of *Streptococcus gordonii* interacts with anionic lipids of the host cell membrane. The electrostatic interaction was found to be a prerequisite for bacterial preprotein entry across cell membranes and the consecutive bacterial translocation (Spencer et al. 2018).

Liposomes were used in a separate example, to examine the effect of lipoarabinomannan (LAM), a component of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall, on membrane structure. This allowed the mechanistic basis of LAM to be identified for bacterial survival within macrophages. Using fluorescence resonance energy transfer (FRET), it was shown that, after insertion into the liposome bilayer, LAM inhibits the fusion of liposomes having a lipid composition mimicking the phagosomal membrane. Indeed a classic use of FRET is for monitoring lipid exchange or mixing and membrane fusion. Moreover, AFM imaging of lipid domains within a SLB exposed to LAM showed that LAM modifies the lipid distribution and packing, leading to a reorganization of lipid domains. This study neatly described how bacterial lipids can lead to the bacterial persistency within the immature phagosomal compartment of macrophages (Hayakawa et al. 2007).

4.2 Liposomes as Tools for Biosensing

The ability of some proteins such as toxins secreted by bacteria to insert in and then modify the physical properties of the lipid bilayer can be detected by biosensing systems. Zhou and co-authors developed a sensing methodology to detect pathogenic bacteria at an infected wound. The assay was based on the quantification of the release of a fluorescence dye from the lumen of liposomes upon exposure to bacterial lytic agents. Thus, the pathogenic state of the bacteria could be assessed (Zhou et al.

2018). Based on the same principle, the membrane perturbing actions of several bacterial toxins were studied by monitoring the release of a fluorescent dye from liposomes. Recent applications are the vacuolating cytotoxin A (VacA), from *H. pylori* (Linn et al. 2018) or the Hemolysin A, the major virulence factor of *Staphylococcus aureus*. The authors have demonstrated that an inhibitor of ATP-gated purinergic receptors (P2XR) interferes with the function of a bacterial pore-forming protein through a direct inhibition of its binding to the membrane and oligomer formation (Schwiering et al. 2017).

4.3 Bacterial Toxin Interaction with Tethered Bilayer Models

Due to their covalent anchoring to the substrate, tethered bilayer lipid membranes (tBLMs) are considerably more robust than freestanding lipid bilayers. Among all the surface sensitive techniques that can be coupled to these models, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) can be applied for studying the mode of interaction with lipid membranes of several membranotropic peptides (Atanasov et al. 2006). Indeed, depending on their molecular architecture, the tBLMs could provide a fluid lipid bilayer platform having a high resistivity, highly suited for quantifying the pore-forming ability of toxins produced by bacteria.

In EIS, an alternating voltage is applied over a range of frequencies and the resulting current is measured along with the time delay between a change in the applied potential and the resulting current. The resistance and phase difference between voltage and current changes can be fitted to an equivalent circuit composed of resistance and capacitance describing the electrical properties of the membrane (Fig. 4). For tBLMs, EIS measurements provide information about the quality of the lipid bilayer and charge transport processes across the membrane, for example, by extricated or incorporated channel proteins.

This approach was employed for the characterization of cyanotoxins. The action of a member of the microcystin (MC) family on the lipid membrane was investigated using tethered lipid bilayers (tBLMs). The cyanotoxin class of hepatotoxic MC is responsible for animal and human poisoning cases due to bioaccumulation in the liver. This study demonstrated that contrary to the original hypothesis, MC-Leucine Arginine (LR) membrane exposure leads only to small and transient variations in the membrane capacitance, showing that MC-LR is not able to accumulate in cell membranes and modify their integrity (Facey et al. 2019).

The combination of tBLMs and EIS measurements brings a more discriminative detection of the nature of the membrane damages caused by bacterial proteins than the liposome-based assays described above. An assay allowing the detection of toxins and bacterial enzymes was developed by coupling tBLMs with SPR spectroscopy and EIS (Tun et al. 2011). The tBLM used in this study is tethered by a mixture of 2,3-di-O-phytanil-glycerol-1-tetraethylene glycol-D,L-lipoic ester lipid (DPhyTL) and cholesterol-pentaethyleneglycol. tBLMs integrating DPhyTL are well known to be dense lipid membranes with high electrical sealing properties (Naumann et al. 2003). The combination of these two techniques allows

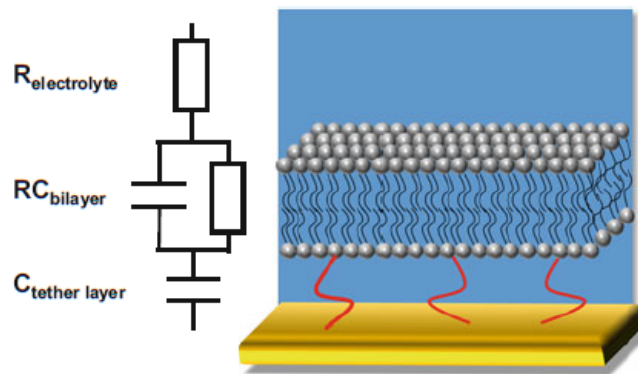


Fig. 4 Scheme of a tBLM (right) and an example of equivalent circuit modeling the resulting impedance data (left). The R(RC)C-circuit consists of a RC element describing the bilayer in series with a capacitor ($C_{\text{tether layer}}$) corresponding to the tether layer and gold interface and an electrolyte resistance ($R_{\text{electrolyte}}$)

investigators to differentiate between pore formation caused by pore-forming toxins or the lipid loss resulting from lipase action.

The design of tBLMs can be adapted in order to study more complex sequence of events involving bacterial toxins. The binding and the consecutive translocation of the adenylate cyclase toxin (CyaA) were successfully reconstituted and quantified under controlled conditions of calcium concentration and membrane potential (Veneziano et al. 2013). The CyaA toxin is one of the major virulence factors produced by *Bordetella pertussis*. It is a particularly complex protein of 1706-residues and consisting of several active domains. Once translocated across the plasma membrane, the N-terminal catalytic domain (CD) of CyaA binds to calmodulin and catalyzes the production of supraphysiologic level of cAMP (O'Brien et al. 2017). A new tBLM construction was specifically developed to study the in vitro binding of CyaA to lipid membrane and the consecutive translocation of its CD across the lipid bilayer. The bilayer was assembled over a surface derivatized with the protein calmodulin in order to differentiate the external and internal aqueous compartments that are separated by the tethered bilayer. This particular design allows taking into account the underlying cytosolic compartment. It was demonstrated that the bilayer acts as a fluid and protein-impermeable barrier (Rossi et al. 2011). Surface plasmon resonance spectroscopy, application of a controlled membrane potential, and an enzymatic assay were combined in order to monitor the protein binding in real time and to quantify the enzymatic activity resulting from the CD/CaM association. It was found that the translocation of the CyaA catalytic domain is strictly dependent on the presence of calcium and the application of a negative transmembrane potential across the tethered lipid bilayer (Veneziano et al. 2013). Beyond the study done on the CyaA toxin, this biomimetic design provides an unique tool to explore in vitro the molecular mechanisms of protein translocation across biological membranes in precisely defined conditions (Veneziano et al. 2013, 2017)

4.4 Whole-Bacteria Interaction with Membrane Models

While the action on lipid membrane of proteins produced by bacteria have been studied using membrane models, very little attention has been applied for lipid bilayer systems by studying the interaction of whole bacteria with cell membrane structures.

To our knowledge, the membrane model structures employed for such studies have been exclusively vesicles. Functionalized GUVs (~15–60 μm) have been employed to monitor the interaction of whole bacteria with liposomal nanoparticles by electronic absorption spectroscopy and FRET. It was based on the interaction of the glucose molecules tagged on liposomes with the glycoproteins present on the surface of *E. coli* (Dogra et al. 2012). The same type of interaction was also exploited to investigate the propulsion of lipid vesicles using the strength of *E. coli* bacteria motility as a function of the size of the vesicles (Dogra et al. 2016). The glycolipid-mediated interactions of bacteria with liposomes of different sizes (SUVs, LUVs, and GUVs) were evaluated by FRET microscopy. The authors demonstrated that SUVs and LUVs could be transported by bacteria while increasing their velocity, dependent on the size ratio between the bacteria and vesicle elements. In this study, any bacterial interaction with the liposomes composed of a pure lipid bilayer could be detected.

5 Research Needs

Bacterial adhesion to host tissue is a long-standing area of research, yet the interactions with lipids in this process remain an understudied topic. The major challenges that need to be addressed include:

- *Understanding fatty acids (FA) function for bacterial adhesion and colonization.* A small number of studies have been focused on the role of FA when bacteria invade host tissues although the physical state of the cells is dependent on the FA composition of the PM (Marsh 2010). Published studies are limited: in one study, use of membrane fluidizers like hexanol, benzyl alcohol, and 2-(2-methoxyethoxy)ethyl 8-(*cis*-2-*n*-octylcyclopropyl)octanoate on human epithelial cell line. However, the approach doesn't fully address this question as it cannot discount side effects of the fluidizers on the cell lines (Ismaili et al. 1999). In another approach, cell lines incubated with different fatty acids and *Lactobacillus spp* illustrated the impact of FA on probiotic bacteria adhesion (Kankaanpää et al. 2001). Thus, by combining biomimetic membrane models and cell lines with such approaches, new mechanisms could be highlighted in host-pathogen interactions.
- *Use transmembrane receptors with different plasma membrane lipid composition.* The impact of different PM compositions on transmembrane proteins remains unknown for bacterial adhesion and immune response. The use of

biomimetic membranes with controlled lipid composition in presence of reconstituted receptors could be an elegant approach to answer this question.

- *Characterizing molecular recognition.* To develop new molecular-based methods to combat bacterial infection, the scientific community needs to understand precisely which adhesins bind to specific PM lipids. Unfortunately, for most bacteria, this remains to be addressed.
- *Cholesterol implication in bacterial colonization.* Cholesterol-rich microdomains at the host PM have been identified in the internalization steps of several bacteria (Mañes et al. 2003). In most reports, cholesterol was removed with the appropriate drug. An alternative approach has employed mouse embryonic fibroblasts lacking the final enzyme required for cholesterol synthesis to investigate the role of cholesterol in bacterial penetration of host cells (Gilk et al. 2013). However, the precursor of cholesterol, desmosterol, that replaces cholesterol in the cellular PM of these mice may still participate in bacterial internalization (Rodríguez-Acebes et al. 2009). Therefore, additional work is needed to develop new strategies to study the real impact of cholesterol in bacterial adhesion and internalization.

Bacterial adhesion and manipulation of host membrane lipids still need to be better documented. Understanding how bacteria hijack PM organization will underlie new strategies to fight bacterial infection. While encouraging findings are emerging, major steps are still needed to better characterize the various strategies used by bacteria to target host lipids.

References

- Abby SS, Rocha EPC (2012) The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet*:8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002983>
- Adamo R, Sokol S, Soong G et al (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:627–634. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0260OC>
- Aly KA, Krall L, Lottspeich F, Baron C (2008) The type IV secretion system component VirV5 binds to the trans-zeatin biosynthetic enzyme Tzs and enables its translocation to the cell surface of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 190:1595–1604. <https://doi.org/10.1128/JB.01718-07>
- Atanasov V, Atanasova PP, Vockenroth IK et al (2006) A molecular toolkit for highly insulating tethered bilayer lipid membranes on various substrates. *Bioconjug Chem* 17:631–637. <https://doi.org/10.1021/bc050328n>
- Basler M, Pilhofer M, Henderson GP et al (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483:182–186. <https://doi.org/10.1038/nature10846>
- Belotserkovsky I, Brunner K, Pinaud L et al (2018) Glycan-glycan interaction determines *Shigella* tropism toward human T lymphocytes. *MBio* 9:1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02309-17>
- Beresford N, Patel S, Armstrong J et al (2007) MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. *Biochem J* 406:13–18. <https://doi.org/10.1042/BJ20070670>
- Boucrot E, Beuzón CR, Holden DW et al (2003) *Salmonella typhimurium* SifA effector protein requires its membrane-anchoring C-terminal hexapeptide for its biological function. *J Biol Chem* 278:14196–14202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207901200>

- Brian AA, McConnell HM (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6159–6163. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.6159>
- Broberg CA, Zhang L, Gonzalez H et al (2010) A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science* 329:1660–1662. <https://doi.org/10.1126/science.1192850>
- Cacas J-L, Buré C, Grosjean K et al (2016) Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids. *Plant Physiol* 170:367–384. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00564>
- Chan YGY, Cardwell MM, Hermanas TM et al (2009) Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* 11:629–644. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x>
- Charkowski AO, Alfano JR, Preston G et al (1998) The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol* 180:5211–5217. <https://doi.org/10.1063/1.2927482>
- Cherrak Y, Rapisarda C, Pellarin R et al (2000) Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0260-1>
- Christie PJ, Whitaker N, González-Rivera C (2014) Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 1843:1578–1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.019>
- Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A et al (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 13:343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS (2010) Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol* 192:2981–2990. <https://doi.org/10.1128/JB.01620-09>
- Day CA, Kenworthy AK (2015) Functions of cholera toxin B-subunit as a raft cross-linker. *Essays Biochem* 57:135–145. <https://doi.org/10.1042/bse0570135>
- Deng W, Marshall NC, Rowland JL et al (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 15:323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>
- Dodson KW, Pinkner JS, Rose T et al (2001) Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* 105:733–743. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00388-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00388-9)
- Dogra N, Li X, Kohli P (2012) Investigating ligand–receptor interactions at bilayer surface using electronic absorption spectroscopy and fluorescence resonance energy transfer. *Langmuir* 28:12989–12998. <https://doi.org/10.1021/la300724z>
- Dogra N, Izadi H, Vanderlick TK (2016) Micro-motors: a motile bacteria based system for liposome cargo transport. *Sci Rep* 6:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep29369>
- Duncan MJ, Li G, Shin J-S et al (2004) Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *J Biol Chem* 279:18944–18951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400769200>
- Eckhardt M (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93–103. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8022-3>
- Eierhoff T, Bastian B, Thuenauer R et al (2014) A lipid zipper triggers bacterial invasion. *Proc Natl Acad Sci* 111:12895–12900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402637111>
- Emam A, Yu AR, Park HJ et al (2006) Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids in vitro or during type IV pili-mediated initial host cell attachment. *Microbiology* 152:2789–2799. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28863-0>
- Evans LDB, Hughes C, Fraser GM (2014) Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol* 22:566–572. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.009>
- Faber E, Gripp E, Maurischat S et al (2016) Novel immunomodulatory flagellin-like protein FlaC in *Campylobacter jejuni* and other *Campylobacteriales*. *mSphere* 1:1–24. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00028-15>

- Facey JA, Steele JR, Violi JP et al (2019) An examination of microcystin-LR accumulation and toxicity using tethered bilayer lipid membranes (tBLMs). *Toxicon* 158:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.432>
- Feldman M, Bryan R, Rajan S et al (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66:43–51. <https://iaj.asm.org/>
- Flaugnatti N, Le TTH, Canaan S et al (2016) A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol Microbiol* 99:1099–1118. <https://doi.org/10.1111/mmi.13292>
- Friedlander RS, Vogel N, Aizenberg J (2015) Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. *Langmuir* 31:6137–6144. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00815>
- Geissler B (2012) Bacterial toxin effector-membrane targeting: outside in, then back again. *Front Cell Infect Microbiol* 2:1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00075>
- Geny B, Popoff MR (2006) Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol Cell* 98:667–678. <https://doi.org/10.1042/BC20050082>
- Gilk SD, Cockrell DC, Luterbach C et al (2013) Bacterial colonization of host cells in the absence of cholesterol. *PLoS Pathog* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003107>
- Green ER, Meccas J (2016) Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiol Spectr* 4:215–239. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S (2018) Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 107:455–471. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
- Ham H, Sreelatha A, Orth K (2011) Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nat Rev Microbiol* 9:635–646. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2602>
- Harayama T, Riezman H (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM et al (1999) Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* 32:151–158. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01338.x>
- Hayakawa E, Tokumasu F, Nardone GA et al (2007) A *Mycobacterium tuberculosis*-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains. *Biophys J* 93:4018–4030. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104075>
- Hilbi H (2006) Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol* 8:1697–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00793.x>
- Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G (2017) A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15:365–379. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.40>
- Hwang HH, Gelvin SB (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* 16:3148–3167. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026476.1>
- Ismaili A, Meddings JB, Ratnam S, Sherman PM (1999) Modulation of host cell membrane fluidity: a novel mechanism for preventing bacterial adhesion. *Am J Physiol* 277:G201–G208. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.1.G201>
- Ji H, Dong H (2015) Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane. *Mol Plant Pathol* 16:762–773. <https://doi.org/10.1111/mpp.12223>
- Kankaanpää PE, Salminen SJ, Isolauri E, Lee YK (2001) The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 194:149–153. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00519-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00519-X)
- Khursigara C, Abul-Milh M, Lau B et al (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* 69:6573–6579. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6573-6579.2001>
- Kim JF, Beer SV (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* 180:5203–5210. <https://jb.asm.org/>

- Kline KA, Fälker S, Dahlberg S et al (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>
- Konradt C, Frigimelica E, Nothelfer K et al (2011) The *Shigella flexneri* type three secretion system effector IpgD inhibits T cell migration by manipulating host phosphoinositide metabolism. *Cell Host Microbe* 9:263–272. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.010>
- Krachler AM, Ham H, Orth K (2011) Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 108:11614–11619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102360108>
- Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V (1988) Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci* 85:6157–6161. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.6157>
- Kwok T, Zabler D, Urman S et al (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449:862–866. <https://doi.org/10.1038/nature06187>
- Lafont F (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J* 21:4449–4457. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf457>
- Lee KK, Sheth HB, Wong WY et al (1994) The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol* 11:705–713. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00348.x>
- Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA et al (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci* 106:4154–4159. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106>
- Linn AK, Samainukul N, Sakdee S et al (2018) A *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A: mouse DHFR fusion protein triggers dye release from liposomes. *Curr Microbiol* 75:223–230. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1369-9>
- Los FCO, Randis TM, Aroian RV, Ratner AJ (2013) Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:173–207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>
- Macnab RM (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol* 181:7149–7153. <https://jb.asm.org/>
- Mañes S, Del Real G, Martínez-A C (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* 3:557–568. <https://doi.org/10.1038/nri1129>
- Marcus SL, Wenk MR, Steele-Mortimer O, Finlay BB (2001) A synaptojanin-homologous region of *Salmonella typhimurium* SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett* 494:201–207. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02356-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02356-0)
- Marsh D (2010) Structural and thermodynamic determinants of chain-melting transition temperatures for phospholipid and glycolipids membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1798:40–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2009.10.010>
- Marshall J, Rossez Y, Mairinda G et al (2016) Alternate thermoregulation and functional binding of *Escherichia coli* type 1 fimbriae in environmental and animal isolates. *FEMS Microbiol Lett* 363:1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw251>
- Martinez JJ, Seveau S, Veiga E et al (2005) Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell* 123:1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.046>
- Mattei PJ, Faudry E, Job V et al (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* 278:414–426. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07974.x>
- Miyata ST, Kitaoka M, Brooks TM et al (2011) *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor vasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 79:2941–2949. <https://doi.org/10.1128/IAI.01266-10>
- Miyata ST, Unterweger D, Rudko SP, Pukatzki S (2013) Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog* 9:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>

- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S et al (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312:1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Hayashi T et al (2010) *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* 7:399–411. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.04.005>
- Naumann R, Schiller SM, Giess F et al (2003) Tethered lipid bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* 19:5435–5443. <https://doi.org/10.1021/la0342060>
- Nguyen L, Paulsen IT, Tchieu J et al (2000) Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2:125–144. <https://www.karger.com/Journal/Home/228391>
- Norris FA, Wilson MP, Wallis TS et al (1998) SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 95:14057–14059. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14057>
- O'Brien DP, Durand D, Voegelé A et al (2017) Calmodulin fishing with a structurally disordered bait triggers CyaA catalysis. *PLoS Biol* 15:e2004486. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004486>
- Ofek I, Mirelman D, Sharon N (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265:623–625. <https://doi.org/10.1038/265623a0>
- Pallen M, Gophna U (2007) Bacterial flagella and type III secretion: case studies in the evolution of complexity. *Genome Dyn* 3:30–47. <https://doi.org/10.1159/000107602>
- Parkkinen J, Korhonen TK, Pere A et al (1988) Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. *J Clin Invest* 81:860–865. <https://doi.org/10.1172/JCI113395>
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>
- Prasadarao NV, Wass CA, Hacker J et al (1993) Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by sfaA gene-encoded protein of S-fimbriae. *J Biol Chem* 268:10356–10363. <http://www.jbc.org/>
- Price CTD, Jones SC, Amundson KE, Abu Kwaik Y (2010) Host-mediated post-translational prenylation of novel Dot/Icm-translocated effectors of *Legionella pneumophila*. *Front Microbiol* 1:1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00131>
- Rebaud S, Maniti O, Girard-Egrot AP (2014) Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie* 107:135–142. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>
- Reinicke AT, Hutchinson JL, Magee AI et al (2005) A *Salmonella typhimurium* effector Protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery. *J Biol Chem* 280:14620–14627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500076200>
- Rodríguez-Acebes S, de la Cueva P, Fernández-Hernando C et al (2009) Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol- Δ^{24} -reductase-deficient cell line. *Biochem J* 420:305–318. <https://doi.org/10.1042/BJ20081909>
- Rossez Y, Holmes A, Wolfson EB et al (2014) Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants. *Environ Microbiol* 16:2181–2195. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12315>
- Rossez Y, Wolfson EB, Holmes A et al (2015) Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog* 11:e1004483. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004483>
- Rossi C, Chopineau J (2007) Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. *Eur Biophys J* 36:955–965. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0202-y>
- Rossi C, Doumiati S, Lazzarelli C, Davi M, Meddar F, Ladant D, Chopineau J, Schnur JM (2011) A tethered bilayer assembled on top of immobilized calmodulin to mimic cellular compartmentalization. *PLoS ONE* 6 (4):e19101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019101>

- Russell AB, LeRoux M, Hathazi K et al (2013) Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496:508–512. <https://doi.org/10.1038/nature12074>
- Saier MH (2004) Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol* 12:113–115. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.01.003>
- Salmond PCG (1994) Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacterial. *Annu Rev Phytopathol* 32:181–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.001145>
- Schmiel DH, Wagar E, Karamanou L et al (1998) Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun* 66:3941–3951. <https://iaa.asm.org/>
- Schwarz S, Singh P, Robertson JD et al (2014) VgrG-5 is a *Burkholderia* type VI secretion system-exported protein required for multinucleated giant cell formation and virulence. *Infect Immun* 82:1445–1452. <https://doi.org/10.1128/IAI.01368-13>
- Schwiering M, Husmann M, Hellmann N (2017) P2X-receptor antagonists inhibit the interaction of *S. aureus* hemolysin a with membranes. *Toxins (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9100332>
- Sheahan KL, Isberg RR (2015) Identification of mammalian proteins that collaborate with type III secretion system function: involvement of a chemokine receptor in supporting translocon activity. *MBio* 6:1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.02023-14>
- Song YC, Jin S, Louie H et al (2004) FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* 53:541–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04175.x>
- Spencer C, Bensing BA, Mishra NN, Sullam PM (2018) Membrane trafficking of the bacterial adhesin GspB and the accessory Sec transport machinery. *J Biol Chem* 5. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005657>
- Steiner B, Weber S, Hilbi H (2018) Formation of the *Legionella*-containing vacuole: phosphoinositide conversion, GTPase modulation and ER dynamics. *Int J Med Microbiol* 308:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.08.004>
- Subramanian N, Qadri A (2006) Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. *Nat Immunol* 7:583–589. <https://doi.org/10.1038/ni1336>
- Takahashi T, Suzuki T (2012) Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J Lipid Res* 53:1437–1450. <https://doi.org/10.1194/jlr.R026682>
- Tanaka M, Sackmann E (2005) Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 437:656–663. <https://doi.org/10.1038/nature04164>
- Tawk C, Nigro G, Rodrigues Lopes I et al (2018) Stress-induced host membrane remodeling protects from infection by non-motile bacterial pathogens. *EMBO J* 37:e98529. <https://doi.org/10.15252/embj.201798529>
- Tilley SJ, Saibil HR (2006) The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol* 16:230–236. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.008>
- Tun TN, Cameron PJ, Jenkins ATA (2011) Sensing of pathogenic bacteria based on their interaction with supported bilayer membranes studied by impedance spectroscopy and surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* 28:227–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.023>
- Väisänen V, Tallgren L, Helena Mäkelä P et al (1981) Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *Lancet* 318:1366–1369. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)92796-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)92796-3)
- Van Der Goot FG, Van Nhieu GT, Allaoui A et al (2004) Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J Biol Chem* 279:47792–47798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406824200>
- van Heyningen S (1974) Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* 183:656–657. <https://doi.org/10.1126/science.183.4125.656>
- van Meer G, de Kroon AIPM (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci* 124:5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>

- Veneziano R, Rossi C, Chenal A et al (2013) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci* 110:20473–20478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312975110>
- Veneziano R, Rossi C, Chenal A et al (2017) Synthesis and characterization of tethered lipid assemblies for membrane protein reconstitution (review). *Biointerphases* 12:04E301. <https://doi.org/10.1116/1.4994299>
- Young GM, Schmiel DH, Miller VL (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6456–6461. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6456>
- Zhao Q, Busch B, Jiménez-Soto LF et al (2018) Integrin but not CEACAM receptors are dispensable for *Helicobacter pylori* CagA translocation. *PLoS Pathog* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007359>
- Zhou J, Yao D, Qian Z et al (2018) Bacteria-responsive intelligent wound dressing: simultaneous in situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials* 161:11–23. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.024>

1 **Flagella methylation promotes bacterial adhesion and**
2 **host cell invasion**

3 Julia A. Horstmann^{1,2,#}, Michele Lunelli^{3,#}, Hélène Cazzola⁴, Johannes Heidemann⁵,
4 Caroline K uhne⁶, Pascal Steffen⁷, Sandra Szefs¹, Claire Rossi⁴, Ravi K. Lokareddy⁸,
5 Chu Wang³, Kelly T. Hughes⁹, Charlotte Uetrecht^{5,10}, Hartmut Schl uter⁷, Guntram A.
6 Grassl¹¹, Theresia E.B. Stradal², Yannick Rossez⁴, Michael Kolbe^{3,12,\$,*}, Marc
7 Erhardt^{1,6,\$,*}

8 ¹Junior Research Group Infection Biology of *Salmonella*, Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstra e 7,
9 38124 Braunschweig, Germany

10 ²Department of Cell Biology, Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstra e 7, 38124 Braunschweig,
11 Germany

12 ³Department for Structural Infection Biology, Center for Structural Systems Biology (CSSB) & Helmholtz Centre for
13 Infection Research, Notkestra e 85, 22607 Hamburg, Germany

14 ⁴Universit e de Technologie de Compiègne, Alliance Sorbonne Université, UMR7025 CNRS Enzyme and Cell
15 Engineering Laboratory, Rue Roger Coultolenc, CS 60319, 60203 Compiègne Cedex, France

16 ⁵Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Martinistra e 52, 20251 Hamburg, Germany

17 ⁶Humboldt-Universität zu Berlin, Institute for Biology – Bacterial Physiology, Philippstr. 13, 10115 Berlin, Germany

18 ⁷Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mass Spectrometric Proteomics Group, University Medical
19 Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany

20 ⁸Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University, 1020 Locust Street, Philadelphia,
21 Pennsylvania 19107, USA

22 ⁹University of Utah, Department of Biology, Salt Lake City, UT 84112, USA

23 ¹⁰European XFEL GmbH, Holzkoppel 4, 22869 Schenefeld, Germany

24 ¹¹Institute of Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Medizinische Hochschule Hannover, and German
25 Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Hannover-Braunschweig, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover,
26 Germany

27 ¹²MIN-Faculty University Hamburg, Rothenbaumchaussee 19, 20148 Hamburg, Germany

28

29

30 *Correspondence to:

31 Marc Erhardt; E-Mail: marc.erhardt@hu-berlin.de; Tel: +49 30 2093 49780

32 Michael Kolbe; E-Mail: michael.kolbe@helmholtz-hzi.de; Tel: +49 40 8998 87550

33

34 [#]Co-first authors, ^{\$}Co-senior authors

35 **Abstract:**

36 The flagellum is the motility device of many bacteria and the long external filament is
37 made of several thousand copies of a single protein, flagellin. While posttranslational
38 modifications of flagellin are common among bacterial pathogens, the role of lysine
39 methylation remained unknown. Here, we show that both flagellins of *Salmonella*
40 *enterica*, FliC and FljB, are methylated at surface-exposed lysine residues. A
41 *Salmonella* mutant deficient in flagellin methylation was outcompeted for gut
42 colonization in a gastroenteritis mouse model. In support, methylation of flagellin
43 promoted invasion of epithelial cells *in vitro*. Lysine methylation increased the surface
44 hydrophobicity of flagellin and enhanced flagella-dependent adhesion of *Salmonella* to
45 phosphatidylcholine vesicles and epithelial cells. In summary, posttranslational flagellin
46 methylation constitutes a novel mechanism how flagellated bacteria facilitate adhesion
47 to hydrophobic host cell surfaces and thereby contributes to efficient gut colonization
48 and successful infection of the host.

49

50

51

52

53

54

55 **Keywords:** host-pathogen interaction, *Salmonella*, post-translational modification,
56 protein methylation, flagella, flagellin, bacterial motility, invasion, hydrophobicity, lipids

57 **Introduction:**

58 The Gram-negative enteropathogen *Salmonella enterica* uses a variety of strategies to
59 successfully enter and replicate within a host. In this respect, bacterial motility enables
60 the directed movement of the bacteria towards nutrients or the target site of infection. A
61 rotary nanomachine, the flagellum, mediates motility of many bacteria, including
62 *Salmonella enterica*¹. Flagella also play a central role in other infection processes,
63 involving biofilm formation, immune system modulation and adhesion²⁻⁴.

64 The eukaryotic plasma membrane plays an important role in the interaction of
65 flagellated bacteria with host cells during the early stages of infection⁵. The flagella of *S.*
66 *enterica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* can function as adhesion
67 molecules⁶⁻⁸ mediating the contact to various lipidic plasma membrane components,
68 including cholesterol, phospholipids, sulfolipids and the gangliosides GM1 and aGM1⁹⁻
69 ¹².

70 Structurally, the flagellum consists out of three main parts: the basal body embedded
71 within the inner and outer membranes of the bacterium, a flexible linking structure - the
72 hook, and the long, external filament, which functions as the propeller of the motility
73 device¹³. The filament is formed by more than 20,000 subunits of a single protein,
74 flagellin. Many *S. enterica* serovars express either of two distinct flagellins, FliC or FliB,
75 in a process called flagellar phase variation^{14,15}. FliC-expressing bacteria display a
76 distinct motility behavior on host cell surfaces and a competitive advantage in
77 colonization of the intestinal epithelia compared to FliB-expressing bacteria¹⁶. However,
78 while the structure of FliC has been determined previously¹⁷, the structure of FliB
79 remained unknown.

80 The many thousand surface-exposed flagellin molecules are a prime target of the host's
81 immune system. Accordingly, many flagellated bacteria have evolved mechanisms to
82 prevent flagellin recognition, *e.g.* by posttranslational modifications of flagellin. Flagellin
83 glycosylation is relatively common among *Enterobacteriaceae*¹⁸, in *Campylobacter*,
84 *Aeromonas* and *Pseudomonas* species^{19–21} and plays a critical role in adhesion, biofilm
85 formation or mimicry of host cell surface glycans^{22,23}.

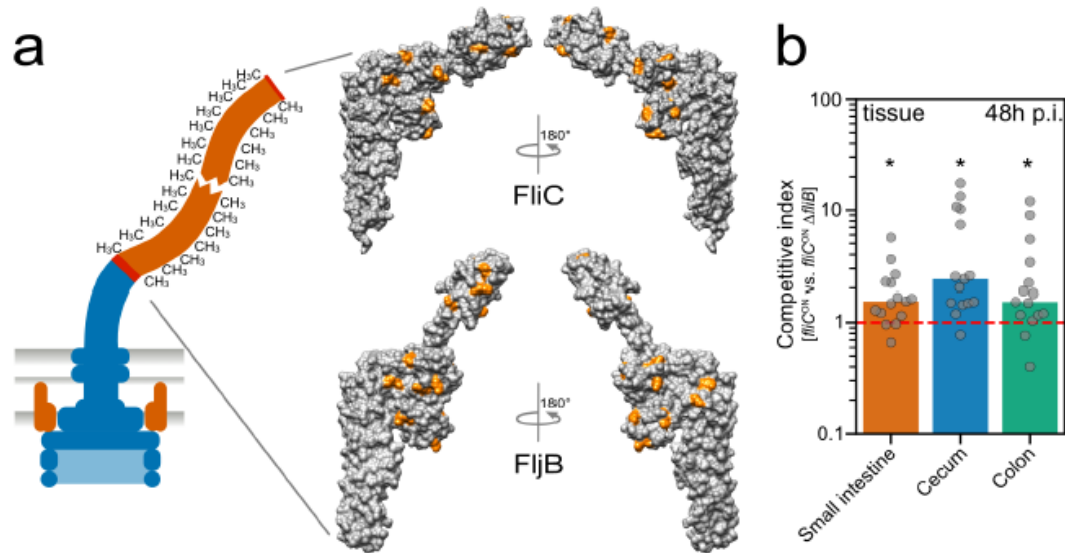
86 *S. enterica* does not posttranslationally glycosylate its flagellins. However, ϵ -N-
87 methylation at lysine residues of flagellin via the methylase FliB has been reported^{24–26}.
88 Although flagellin methylation was first reported in 1959²⁵, the physiological role of the
89 methylation remained elusive. Previous studies indicated that the absence of FliB had
90 no significant effect on swimming and swarming motility suggesting that flagellin
91 methylation might be required for virulence of *Salmonella*^{27,28}.

92 In the present study, we analyzed the role of flagellin methylation for motility and
93 virulence of *S. enterica in vivo* and *in vitro*. Our results demonstrate that *S. enterica*
94 exploits methylated flagella to adhere to hydrophobic host cell surfaces. Thus, the
95 posttranslational methylation of flagellin plays an important role for invasion of host
96 cells, and accordingly, productive colonization of the host's epithelium.

97 Results

98 Previous studies suggested that the flagellins of *S. enterica* are posttranslationally
99 methylated, however, the identity of the methylated lysine residues remained largely
100 unknown^{25,26,29}. We performed mass spectrometry analyses with high sequence
101 coverage of both flagellins FliC and FljB isolated from *S. enterica* genetically locked in
102 expression of FliC (*fliC^{ON}*) or FljB (*fljB^{ON}*), respectively, and isogenic mutants of the
103 methylase FliB (Δ *fliB*) (Supplementary Fig. S1). In order to map the identified ϵ -N-
104 methyl-lysine residues to the structure of both flagellins, we determined the crystal
105 structure of FljB (Supplementary Fig. S2, Supplementary Text S1). The tertiary structure
106 of FljB resembles, similar to FliC, a boomerang-shape with one arm formed by the D1
107 domain and the other formed by D2 and D3¹⁷. However, in FljB compared with FliC the
108 variable D3 domain is rotated about 90° around the axis defined by the D2-D3 arm,
109 resulting in the widening angle of about 20° between the two boomerang's arms (Fig.
110 1a, Supplementary Fig. S2). Interestingly, the methylated lysine residues are primarily
111 located in the surface-exposed D2 and D3 domains of both flagellins (Fig. 1a,
112 Supplementary Fig. S2d). In FliC, 16 out of 28 lysine residues and in FljB, 19 out of 30
113 lysine residues were methylated. We note that the methylation of 15 lysines of FliC and
114 18 lysines of FljB was dependent on the presence of FliB, while only one lysine in FljB
115 and one in FliC was methylated in the absence of FliB (Δ *fliB*). 10 of the identified lysines
116 were methylated in both FliC and FljB flagellins, while 6 and 9 methylation sites were
117 unique to FliC and FljB, respectively (Supplementary Fig. S2d). Interestingly, conserved

118 lysines were methylated in a FliB-dependent manner in both flagellins except for Lys³⁹⁶
 119 in FliB that is not modified in the corresponding Lys³⁸⁵ in FliC.



120

121 **Fig. 1: Surface-exposed methylation of flagellin contributes to efficient colonization of the murine**
 122 **intestine.** (a) Schematic of a methylated flagellar filament and surface representation of the structure of
 123 FliC (top) and FliB (bottom). FliB-dependent methylation sites are highlighted in orange. (b) Streptomycin
 124 pre-treated C57BL/6 mice were infected with 10⁷ CFU of the FliC-expressing WT (*fliC*^{DN}) and isogenic
 125 Δ *fliB* mutant, each harboring a different antibiotic resistant cassette. The organ burden (small intestine,
 126 colon and cecum lumen and tissue, respectively) was determined two days post-infection and used to
 127 calculate the competitive indices (CI). Each mouse is shown as an individual data point and significances
 128 were analyzed by the Wilcoxon Signed Rank test. The bar graph represents the median of the data and
 129 asterisks indicate a significantly different phenotype to the value 1 (* = $p < 0.05$).

130

131 We next aligned the amino acid sequences of FliB and FliC up- and downstream of the
 132 identified ϵ -N-methyl-lysine residues (± 6 residues, Supplementary Fig. S3). Although
 133 no clear consensus sequences could be determined, we found prevalence of small (Ala,

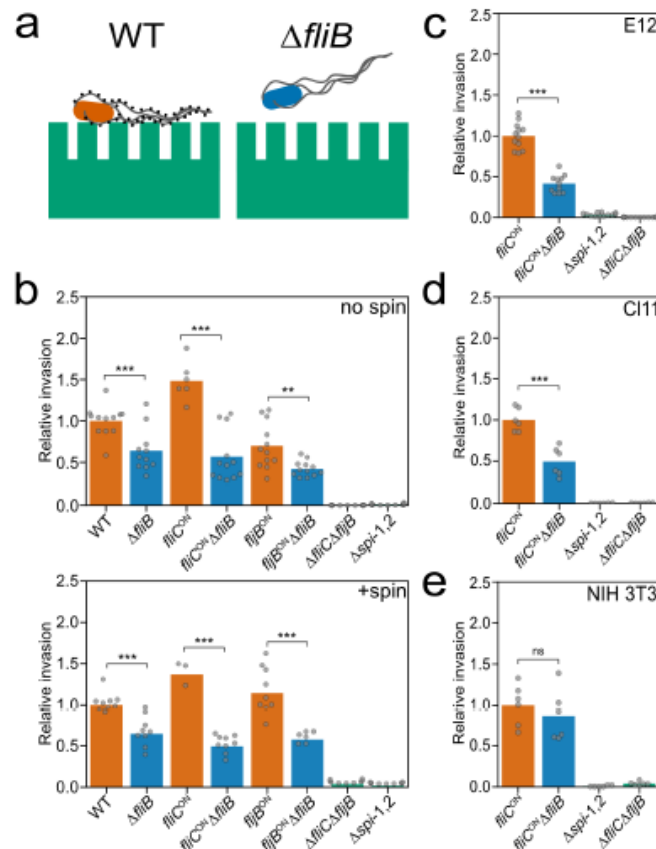
134 Gly, Thr, Val, Ser) and negatively charged (Asp) residues around the methylated
135 lysines. Interestingly, a scan of the local sequences that surround methylated lysines
136 using ScanProsite³⁰ matched the profile of the bacterial Ig-like domain 1 (Big-1) for 11
137 and 10 FliB-dependent modifications in FliB and FliC, respectively, although with low
138 confidence level (Supplementary Table S2). We note that the Big-1 domain is present in
139 adhesion proteins of the intimin/invasin family, which are crucial in bacterial
140 pathogenicity mediating host-cell invasion or adherence^{31–33}.

141 Based on the weak homology of the methylation sites to the Big-1 domain and the
142 absence of a motility phenotype in non-methylated flagellin mutants (Supplementary
143 Fig. S4, Supplementary Text S2), we hypothesized that flagellin methylation might play
144 a role in *Salmonella* virulence. We thus co-infected streptomycin-pre-treated mice³⁴ with
145 the wildtype (WT) and an isogenic $\Delta fliB$ mutant (Fig. 1b). Organ burden analysis two
146 days post-infection revealed that the $\Delta fliB$ strain was significantly outcompeted by the
147 WT in the gastroenteritis mouse model, especially in the cecal tissue (Fig. 1b,
148 competitive indices >1), suggesting that methylated flagella play an important role for
149 efficient colonization of the intestinal epithelium.

150 We next tested if invasion of epithelial cells *in vitro* was also dependent on flagellin
151 methylation (Fig. 2a). We first infected murine MODE-K epithelial cells with the WT and
152 *S. enterica* strains deficient in the methylase FliB and determined the number of
153 intracellular bacteria. Invasion was reduced about 50% for the $\Delta fliB$ mutant strain
154 independently of the flagellin type (Fig. 2b, top). We also observed a similar invasion
155 defect for the $\Delta fliB$ mutant when we forced contact of the bacteria with the epithelial

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/774588>. The copyright holder for this preprint (which was not peer-reviewed) is the author/funder. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

156 cells using centrifugation (Fig. 2b, bottom), suggesting that the invasion defect of the
 157 $\Delta fliB$ mutant did not depend on active bacterial motility.



158

159 **Fig. 2: Flagella methylation facilitates eukaryotic cell invasion.** (a) Schematic illustration of productive
 160 adhesion and invasion of eukaryotic epithelial cells dependent on methylated flagella. (b) Invasion of
 161 MODE-K murine epithelial cells depends on methylated flagella. Reported are relative invasion rates of
 162 MODE-K epithelial cells for various flagellin methylation mutants without (top: no spin) or with forced
 163 contact of the bacteria by centrifugation (bottom: +spin). (c-e) Relative invasion rates of different
 164 eukaryotic host cell types. The human epithelial cell line E12, the murine epithelial cell line CI11, and the
 165 murine fibroblast cell line NIH 3T3 were infected with *Salmonella* flagella methylation mutants as
 166 described above. The bar graphs represent the mean of the reported relative invasion rate data

167 normalized to the inoculum. Replicates are shown as individual data points and statistical significances
168 were determined by the Student's *t* test (** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; ns = not significant).

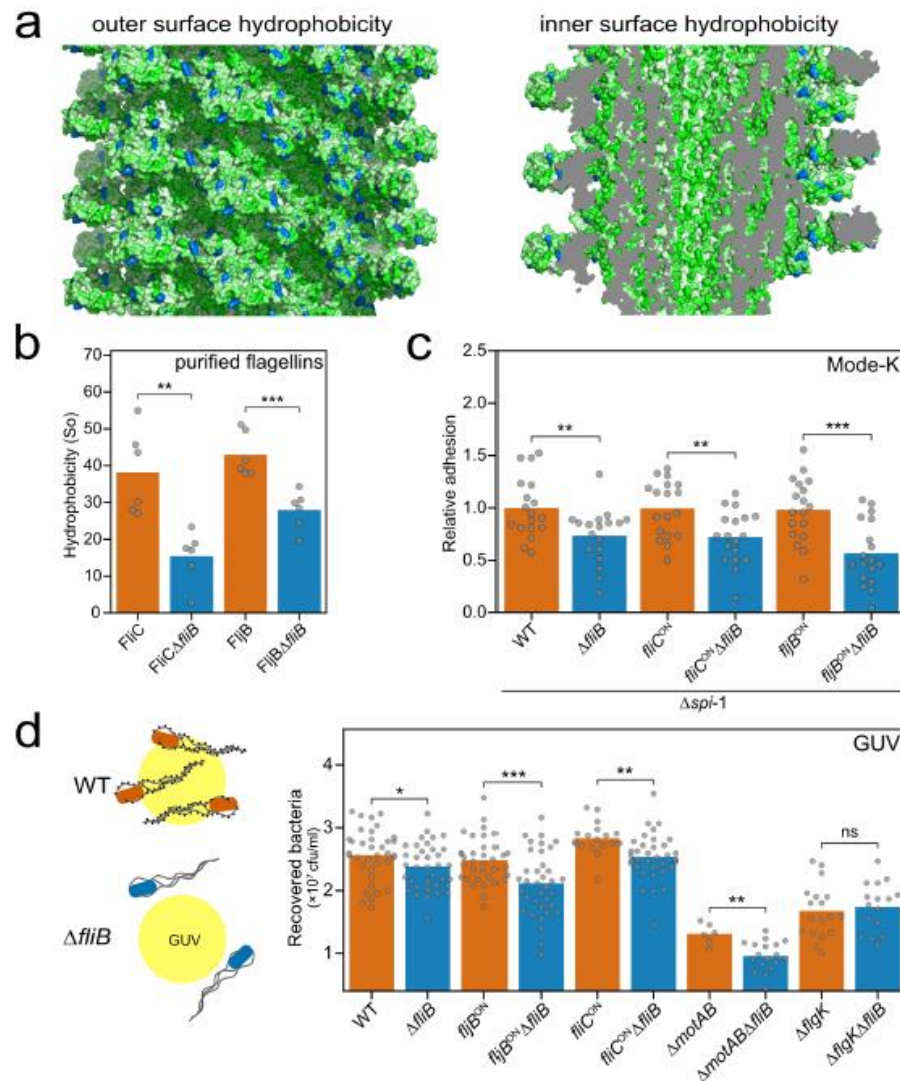
169

170 We further analyzed if the methylation-dependent invasion phenotype was eukaryotic
171 cell-line specific (Fig. 2c-e, Supplementary Fig. S5). The human epithelial cell line E12³⁵
172 and murine intestinal epithelial cell line CI11 mimic the native intestinal environment *in*
173 *vitro*. Similar to the observed invasion rate of MODE-K cells, a $\Delta fliB$ mutant strain
174 displayed a two-fold decreased invasion rate of the human and murine epithelial cell
175 lines compared with the WT. Similarly, in murine epithelial-like RenCa cells, the invasion
176 rate of a $\Delta fliB$ mutant was decreased. Invasion into the murine fibroblast cell lines NIH
177 3T3 and CT26, however, was independent of flagellin methylation, suggesting that the
178 observed invasion phenotype is cell type-specific for epithelial-like cells.

179 We next confirmed that the observed invasion phenotype was due to the lack of *fliB* by
180 complementing expression of *fliB* from an inducible P_{tet} promoter at its native
181 chromosomal locus. Addition of anhydrotetracycline (AnTc) induced *fliB* expression
182 comparable to levels of the WT and restored invasion of MODE-K epithelial cells
183 (Supplementary Fig. S6). We further tested if the observed invasion defect was
184 dependent on the assembly of the methylated flagellar filament. A hook deletion mutant
185 ($\Delta flgE$) does not express flagellin, whereas a mutant of the hook-filament junction
186 proteins ($\Delta flgKL$) expresses and secretes flagellin, but does not assemble the flagellar
187 filament. The methylase FliB is expressed in both $\Delta flgE$ and $\Delta flgKL$ mutant
188 backgrounds²⁷. We observed in neither the $\Delta flgE$ nor the $\Delta flgKL$ mutant a difference in
189 MODE-K epithelial cell invasion in the presence or absence of FliB, suggesting that

190 methylated flagellin must assemble into a functional flagellar filament in order to
191 facilitate epithelial cell invasion (Supplementary Fig. S7).

192 Our results presented above demonstrate that the presence of an assembled,
193 methylated flagellar filament, but not the ability to move *per se*, contributes to the
194 observed defect of *Salmonella* to invade epithelial cells. We thus hypothesized that
195 adhesion to epithelial cells was facilitated through methylated flagella. In particular, we
196 reasoned that the addition of hydrophobic methyl groups to surface-exposed lysine
197 residues (Fig. 1) would affect the hydrophobicity of the flagellar filament. Consistently,
198 the surface hydrophobicity S_o of purified FliC and FljB flagella was significantly reduced
199 in the absence of lysine methylation (Fig. 3a+b, Supplementary Fig. S8). These results
200 suggested that methylated flagella might promote adhesion to hydrophobic molecules
201 present on the surface of epithelial cells. We therefore investigated adhesion of *S.*
202 *enterica* to MODE-K epithelial cells. In order to dissect flagella methylation-dependent
203 adhesion from methylation-dependent invasion of the epithelial cells, we employed
204 *Salmonella* mutants deleted for the *Salmonella* pathogenicity island-1 (*spi-1*), which
205 renders the bacteria unable to invade epithelial cells in an injectisome-dependent
206 manner. We found that adhesion of $\Delta spi-1$ *Salmonella* mutants to MODE-K epithelial
207 cells was reduced up to 50% for strains deficient in flagellin methylation (Fig. 3c). This
208 result suggested that methylated flagella promote adhesion to the hydrophobic surface
209 of epithelial cells or surface-exposed proteinaceous receptors or glycostructures.



210

211 **Fig. 3: Flagella methylation mediates adhesion to hydrophobic surfaces.** (a) Methylation increases
 212 hydrophobicity of the flagellar filament outer surface. Surface hydrophobicity distribution of the outer (left)
 213 and the inner surface (right) of the FliC flagellar filament³⁶ according to the Eisenberg scale³⁷ (from green
 214 to white indicates increasing hydrophobicity) with FliB-dependent methylation sites highlighted in blue. (b)
 215 Measured surface hydrophobicity (So) of methylated and non-methylated (Δ FliB) flagellins using PRODAN
 216 on purified flagellar filaments. (c) Adhesion of *S. enterica* to MODE-K epithelial cells is reduced in the
 217 absence of flagella methylation. Adhesion was monitored using *S. enterica* strains deleted for *spi-1* in

218 order to prevent invasion of the eukaryotic host cells. (d) Adhesion of *S. enterica* to giant unilamellar
219 vesicles (GUV) consisting of phosphatidylcholine from egg chicken is dependent on the presence of
220 methylated flagella. Left: schematic illustration of the adhesion of *Salmonella* to GUVs dependent on
221 methylated flagella. Right: Quantified adhesion of *Salmonella* mutants to GUVs. The bar graphs represent
222 the mean of the reported data. Replicates are shown as individual data points and statistical significances
223 were determined by the Student's *t* test (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; ns = not significant).

224

225 However, we did not observe a significant flagella methylation-dependent effect on
226 adhesion of *Salmonella* to various extracellular matrix proteins, nor to the
227 oligosaccharide mannose, which has previously been shown to mediate adhesion of
228 *Salmonella* and *E. coli* to eukaryotic cells using type I fimbriae^{38–41} (Supplementary Fig.
229 S9). We next tested the possibility that the increased hydrophobicity of methylated
230 flagella might promote adhesion of the bacteria to the hydrophobic plasma membrane of
231 epithelial cells (Fig. 3d). We therefore analyzed the binding of *Salmonella* to giant
232 unilamellar vesicles (GUV) consisting of phosphatidylcholine, the most abundant
233 phospholipid in animal tissues. Interestingly, we observed a reduction in bacterial
234 adhesion to the GUV for *S. enterica* strains deficient in flagellin methylation, but not for
235 the non-flagellated $\Delta flgK$ mutants. In addition, non-motile, but flagellated bacteria
236 ($\Delta motAB$) were less adherent, which supports previous observations that actively
237 rotating flagella are important for the initial interaction with surfaces before biofilm
238 formation⁴¹.

239 Discussion

240 Flagella-dependent motility is crucial for *Salmonella* pathogenesis by enabling directed
241 movement towards host epithelial cells. However, flagella not only play a role in
242 bacterial motility, but also in colonization, adhesion, and biofilm formation^{41–44}. In case
243 of flagella-mediated adhesion to host cells, the primary interactions with the epithelial
244 tissue occur *via* the external filament made of several thousand copies of flagellin and
245 thus represents an excellent adhesion molecule.

246 Here, we describe a novel mechanism of flagella-dependent adhesion to surface-
247 exposed hydrophobic molecules. This adhesion phenotype is dependent on methylation
248 of surface-exposed lysine residues of flagellin by the methylase FliB. Flagellin
249 methylation was first described in *Salmonella* in 1959^{24–26}, however, the physiological
250 relevance remained elusive. We demonstrate that FliB-mediated flagellin methylation is
251 crucial for *Salmonella* pathogenesis in the mouse model and contributes significantly to
252 adhesion and thus invasion of epithelial cells *in vitro*, but does neither affect swimming
253 motility nor flagella assembly (Supplementary Text S3). Analysis of the surface
254 hydrophobicity of purified flagella revealed that methylation of the filament subunits
255 increases the hydrophobicity of the outer surface of the flagellar filament, while the
256 lumen of the flagellar filament seems not to be affected (Fig. 3a+b, Supplementary Fig.
257 S8). We note that the preferential methylation of surface-exposed lysine residues
258 implicates a FliB methylation mechanism involving flagellin assemblies formed in the
259 bacterial cytosol prior to secretion. Further, we found that a single flagellin molecule
260 contains 16 or 19 surface-exposed methylation sites. Since a flagellar filament is made
261 up of up to 20,000 flagellin copies, the methylation of flagellin subunits might

262 substantially increase the overall hydrophobicity of the flagellum. Consistently, we found
263 that adhesion to the surface of epithelial host cells and phospholipid vesicles was
264 dependent on the flagella methylation status. In support, flagella have been recently
265 implicated to mediate adhesion to abiotic surfaces through hydrophobic interactions^{45,46}.
266 We thus speculate that bacteria use flagella to explore the host cell surface as
267 suggested previously⁴⁷ and actively rotating flagella might be able to penetrate the lipid
268 bilayer and interact with the fatty acids buried inside the plasma membrane. Increasing
269 the surface hydrophobicity of the flagellar filament through methylation might improve
270 those hydrophobic interactions for productive adhesion to eukaryotic host cells.

271 Flagellin Methylation Islands (FMI) and thus modifications of flagellins by methylation
272 are common in *Enterobacteriaceae*¹⁸. In addition to *Salmonella*, many bacterial species
273 including *Yersinia*, *Enterobacter*, *Franconibacter*, and *Pantoea* contain chromosomal
274 FMI loci, which encode orthologues of FliB. In summary, FliB-dependent methylation of
275 flagella might represent a general mechanism facilitating adhesion to hydrophobic host
276 cell surfaces in a broad range of bacterial species.

277 **Methods**

278

279 **Ethics statement**

280 All animal experiments were performed according to guidelines of the German Law for
281 Animal Protection and with permission of the local ethics committee and the local
282 authority LAVES (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und
283 Lebensmittelsicherheit) under permission number 33.19-42502-04-13/1191.

284

285 **Strains, media and bacterial growth**

286 All bacterial strain used in this study are listed in Supplementary Table S3 and were
287 derived from SL1344. Bacteria were grown in lysogeny broth (LB)⁴⁸ at 37 °C and growth
288 was measured by optical density at 600 nm. For transductional crosses the generalised
289 transducing phage P22 *HT105/1 int-201* was used⁴⁹. Gene deletions or replacements
290 were produced as previously described⁵⁰. All bacterial strains are available upon
291 request.

292

293 **Cloning and purification of FljB for structural analysis**

294 The truncated gene *fljB* encoding for the protein residues 55-462 was amplified from *S.*
295 *Typhimurium* (SL1344) by standard PCR method and cloned into the expression vector
296 pET28a(+) using the restriction sites NheI and XhoI to obtain N-terminal His-tagged
297 protein. The mutation A190V was found by sequencing. Standard conditions were

298 applied to express His-tagged FliB₅₅₋₄₆₂ in BL21(DE3). The protein was purified from the
299 soluble fraction using HisTrap HP and Superdex 75 columns (GE Healthcare) in 50 mM
300 HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl.

301

302 **Crystallization and data collection**

303 FliB₅₅₋₄₆₂ was concentrated to 12-15 mg/mL and crystals were grown at 18 °C by
304 hanging drop vapour diffusion against 0.1 M Tris (pH 8.5), 20% (w/v) PEG4000, 24%
305 (v/v) isopropanol. Diffraction data were collected using crystals flash-frozen in
306 crystallization buffer. Measurements were carried out at the beamLine BL14.1 at the
307 Helmholtz-Zentrum Berlin synchrotron Bessy II, at the wavelength 0.918 Å and
308 temperature 100 K, obtaining a data set at 2.00 Å resolution. Crystals belong to space
309 group C2, with one FliB molecule in the asymmetric unit (solvent content 51.6%).
310 Indexing, integration, merging and scaling were done using the program XDS⁵¹.

311

312 **Crystal structure determination**

313 The structure was phased by molecular replacement, using the structure of the F41
314 fragment of FliC flagellin as search model (PDB ID 1IO1¹⁷). Cycles of manual building
315 and refinement using Coot⁵² and CNS version 1.3⁵³ led to the final structure, which
316 includes residues 55-459 of FliB with the mutation A190V and the residue S54 present
317 in the crystallised construct. 299 water molecules were also placed. Structural
318 comparison between FliB and FliC has been done with the server PDBeFold v2.59⁵⁴.

319 Molecular structure figures were generated using UCSF Chimera 1.13.1⁵⁵ and PyMol
320 2.2.3 (Schroedinger, LLC (2018). Alignment Fig. S2d was generated with the server
321 ESPript (<https://esript.ibcp.fr>)⁵⁶.

322

323 **Mass spectrometry**

324 *Sample preparation*

325 FliC and FljB purified from the WT and a Δ *fliB* mutant were separated using SDS-
326 PAGE. The corresponding bands were cut from the gel and each was cut into 1x1 mm
327 pieces. An in-gel digestion was performed. For destaining the gel pieces, a 50 mM
328 ammonium bicarbonate (AmBiCa) in 50% acetonitrile (ACN) solution was added and
329 incubated 30 min at room temperature to dehydrate the gel. After removal of the
330 supernatant, 50 mM AmBiCa was added and incubated for 30 min at room temperature
331 to rehydrate the pieces. This step was repeated two times. Disulfide bonds were
332 reduced using 10 mM DTT in 50 mM AmBiCa for 30 min at 56 °C. After cooling to room
333 temperature and removal of the supernatant, the reduced cysteines were alkylated
334 using 55 mM iodoacetamide in 50 mM AmBiCa for 30 min at room temperature in the
335 dark. After removal of the supernatant the gel pieces were dried *in vacuo*. Ice cold 50
336 mM AmBiCa in 10% ACN containing 12.5 ng/ μ L trypsin was added and digested
337 overnight. Peptides were extracted by transferring the supernatant to a fresh collection
338 tube and adding 50 mM AmBiCa in 10% ACN to the gel pieces and transferring the
339 second supernatant into the same collection tube. Peptides were dried *in vacuo* and
340 stored at -20 °C. Before measuring the peptides were reconstituted in 10 μ L 0.1%

341 formic acid (FA) and 1 μ L was injected for measurement. All chemicals were purchased
342 from Sigma-Aldrich. Trypsin was purchased from Promega.

343

344 *Mass Spectrometry*

345 Peptides were measured on a tandem mass spectrometer (Fusion, Thermo Fisher
346 Scientific) coupled to a nano UPLC system (Ultimate 3000 RSLCnano, Thermo Fisher
347 Scientific) with a nano-spray source. Peptides were trapped on a C18 reversed-phase
348 trap column (2 cm x 75 μ m ID; Acclaim PepMap trap column packed with 3 μ m beads,
349 Thermo Fisher Scientific) and separated on a 25 cm C18 reversed-phase analytical
350 column (25 cm x 75 μ m ID, Acclaim PepMap, 3 μ m beads, Thermo Fisher Scientific).
351 The column temperature was kept constant at 45 °C. Peptides were separated using a
352 2-step gradient starting with 3% buffer B (0.1% FA in ACN) and 97% buffer A (0.1% FA
353 in H₂O) with a steady increase to 28% buffer B over 20 min and a second increase to
354 35% over 5 min with a subsequent ramping to 90% buffer B for 10 min followed by a 20
355 min equilibration to 3% buffer B at a constant flow rate of 300 nL/min. Eluting peptides
356 were injected directly into the mass spectrometer. Data were acquired in positive ion
357 mode using data dependent acquisition (DDA) with a precursor ion scan resolution of
358 1.2×10^5 at 200 m/z in a range of 300-1500 m/z with an automatic gain control (AGC)
359 target of 2×10^5 and a maximum injection time of 50 ms. Peptides were selected for
360 fragmentation using the "TopSpeed" method with a threshold of 5000 intensity and a
361 dynamic exclusion time of 30 sec. Peptides were fragmented using higher-energy
362 collision dissociation (HCD) in the C-Trap and fragment spectra were detected in the ion

363 trap. Fragment spectra were recorded using the “Rapid” setting with a maximum
364 injection time of 35 ms and an AGC target of 1×10^4 with the first mass set at 110 *m/z*.

365

366 *Data analysis*

367 Data were analyzed using the ProteomeDiscoverer 2.0 (Thermo Fisher Scientific)
368 software. Spectra were identified using the Sequest HT search engine with precursor
369 mass tolerance set to 10 ppm and the fragment mass tolerance set to 0.5 Da.
370 Carbamidomethylation on cysteine was set as fixed modification and oxidation on
371 methionine, acetylation on protein N-terminus as well as mono-, di- and tri-methylation
372 on lysine were set as variable modifications. Trypsin was set as enzyme and 3 missed
373 cleavages were allowed with a minimum peptide length of 6 amino acids. Spectra were
374 searched against a *Salmonella* Typhimurium FASTA database obtained from UniProt in
375 June 2016 containing 1821 entries and a contaminant database containing 298 entries.
376 Sequence coverage maps were created using PatterLab for proteomics 4.0⁵⁷.

377

378 **Protein secretion assay**

379 Protein secretion into the culture supernatant was analyzed as described before¹⁶.
380 Samples were fractionated under denaturing conditions on SDS-gels (200 OD units)
381 and immunoblotting was performed using primary α -FliC/FliB and secondary α -rabbit
382 antibodies.

383

384 **Motility assay and immunostaining of flagella**

385 Swimming motility was analyzed in semi-solid agar plates as described before⁵⁸. For
386 immunostaining of flagella, logarithmically grown cells were fixed on a poly-L-lysine
387 coated coverslip by 2% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde. Flagellin was stained
388 using polyclonal α -FliC (rabbit, 1:1000 in 2% BSA/PBS) and secondary α -rabbit
389 AlexaFluor488 (goat, 1:1000 in PBS). DNA was stained using DAPI (Sigma-Aldrich).
390 Images were taken as described before^{28,59}.

391

392 **Mouse infection studies**

393 Intragastrical infection of seven weeks old C57BL/6 mice (Janvier) was performed as
394 described in¹⁶. Briefly, mice were infected with 10^7 CFU of two strains containing an
395 antibiotic resistance cassette. Small intestine, cecum and colon were isolated 2 days
396 post-infection and competitive indices (CI) were calculated.

397

398 **Invasion and adhesion assays**

399 The murine epithelial cell lines MODE-K⁶⁰ and CI11, the murine epithelial-like cell line
400 Renca (CRL-2947), the human epithelial cell line HT29-MTX-E12 (E12)³⁵, and the
401 mouse fibroblast cell lines NIH-3T3 (CRL-1658) and CT26 (CRL-2638) were used for
402 invasion assays. The immortalization and characterization of the muGob (CI11) cells will
403 be described elsewhere (Truschel et al., in preparation). Briefly, murine intestinal
404 organoids were plated and infected with different lentiviruses encoding the CI-SCREEN

405 gene library⁶¹. After transduction, the clonal cell line muGob (CI11) was established,
406 which has integrated the following recombinant genes of the CI-SCREEN library: Id1,
407 Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Core, Rex (Zfp42). The muGob (CI11) cell line was cultivated on
408 fibronectin/collagen-coated (InSCREENeX GmbH, Germany) well plates in a humidified
409 atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C in a defined muGob medium (InSCREENeX GmbH,
410 Germany). 2.5x10⁵ cells/mL were seeded in 24-well plates. *Salmonella* strains were
411 added for infection at a MOI of 10 for 1 h. External bacteria were killed by addition of
412 100 µg/mL gentamycin for 1 h and cells were lysed with 1% Triton X-100. Serial
413 dilutions of the lysate were plated to calculate the CFU/mL. All values were normalised
414 to the control strain. To test adhesion to MODE-K cells, cells were seeded and infected
415 with strains lacking *spi-1* to prevent injectisome-dependent invasion. After infection, the
416 MODE-K cells were washed extensively and lysed as described above.

417

418 RNA isolation and quantitative real-time PCR

419 Strains were grown under agitating growth conditions in LB medium and total RNA
420 isolation was performed using the RNeasy Mini kit (Qiagen). For removal of genomic
421 DNA, RNA was treated with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse
422 transcription and quantitative real-time PCRs (qRT-PCR) were performed using the
423 SensiFast SYBR No-ROX One Step kit (Bioline) in a Rotor-Gene Q Lightcycler
424 (Qiagen). Relative changes in mRNA levels were analyzed according to Pfaffl⁶² and as
425 described before²⁸.

426

427 **ECM adhesion assays**

428 For ECM protein adhesion assays, a 96-well plate pre-coated with a variety of ECM
429 proteins was used (EMD Millipore; Collagen I, II, IV, Fibronectin, Laminin, Tenascin,
430 Vitronectin). Wells were rehydrated according to the user's manual and 5×10^7 cells/mL
431 were added. After incubation for 1h at 37 °C, wells were washed extensively and 1%
432 Triton X-100 was added. Colony forming units (CFU)/mL were calculated after plating of
433 serial dilutions and normalised to the inoculum and BSA control.

434

435 **Mannose binding assay**

436 Binding to mannose was determined as described before⁶³ with minor modifications. A
437 black 96-well plate was coated with BSA or mannose-BSA (20 μ g/mL in 50 mM
438 bicarbonate buffer pH 9.5) for 2 h at 37 °C, followed by blocking with BSA (10 mg/mL)
439 for 1 h at 37°C. Adjusted bacterial cultures (OD₆₀₀ 0.6) harboring the constitutive
440 fluorescent plasmid pFU228-*P_{gapdh}*-mCherry were added to the wells to facilitate
441 binding. After 1 h incubation at 37°C, wells were washed with 1x PBS and fluorescence
442 was measured with a Tecan plate reader (excitation 560 nm; emission 630 nm).
443 Fluorescence relative to the binding to BSA was calculated from three technical
444 replicates and the type-I fimbriae-inducible strain *P_{tet}-fimA-F* served as positive control.

445

446 **Flagellar filament isolation**

447 Flagellar filaments were isolated similar as described⁶⁴. Briefly, bacterial cultures were
448 grown in LB media at 37 °C for 16 h in an orbital shaker incubator (Infors HT) at 80 rpm.

449 Cells were harvest by centrifugation at 2,000 x g for 20 min. Cell pellets were re-
450 suspended in TBS buffer pH 7.4 at 4 °C. The flagella were sheared off with a magnetic
451 stirrer at 500 rpm for 1 h, followed by centrifugation at 4,000 x g for 30 min.
452 Supernatants were collected and ammonium sulfate was slowly added while stirring to
453 achieve two-thirds saturation. After overnight incubation, the flagella were harvest by
454 centrifugation at 15,000 x g for 20 min and pellet was re-suspended in TBS buffer at pH
455 7.4. The quality of the purified flagella was checked by SDS-PAGE and transmission
456 electron microscopy of negatively stained samples (microscope Talos L120C, Thermo
457 Fisher Scientific).

458

459 **Hydrophobicity determination**

460 Protein surface hydrophobicity was measured according to a modification of the method
461 of Kato and Nakai⁶⁵ using PRODAN⁶⁶. A stock solution of 1mM PRODAN (prepared in
462 DMSO) was used, 8 μ L was added to successive samples containing 1 mL of diluted
463 flagella in 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl. After homogenization by pipetting,
464 the samples were incubated 10 min in the dark and the relative fluorescence intensity
465 was measured. All fluorescence measurements were made with a Cary Eclipse (Varian
466 now Agilent) spectrofluorometer. Excitation and emission wavelengths were 365 nm
467 and 465 nm, the slit widths were 5 and 5 nm. For standardization, BSA was used.
468 Surface hydrophobicity (S_o) values were determined using at least duplicate analyses.
469 Five measures per sample repeated three times were performed and the mean was
470 used.

471 **Bacterial adhesion to liposomes**

472 Giant unilamellar vesicles (GUV) were prepared according to the polyvinyl alcohol
473 (PVA)-assisted swelling method⁶⁷. Gold-coated glass slides were obtained by thermal
474 evaporation under vacuum (Evaporator Edwards model Auto 306, $0.01 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, $2\text{-}3 \times 10^{-6}$
475 mbar). A gold layer of $10 \pm 1 \text{ nm}$ was deposited on top of a chromium adhesion layer
476 of $1 \pm 0.5 \text{ nm}$. Prior to GUV formation in HEPES buffered saline solution (HEPES 20
477 mM pH 7.4, NaCl 150 mM), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-
478 [PDP(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG-PDP) (Sigma-Aldrich) was mixed with L-
479 α -phosphatidylcholine from egg chicken (Sigma-Aldrich) at a 3 % mass ratio that allows
480 a direct covalent coupling of GUV onto gold surfaces. For the bacterial adhesion assay,
481 a $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ GUV solution was deposited onto a gold-coated glass substrate and
482 incubated one hour for immobilization. Then, the surface was gently rinsed with buffer to
483 remove non-immobilized liposomes. Subsequently bacterial culture at $10^8 \text{ CFU}/\text{mL}$
484 resuspended in HEPES buffer was carefully deposit on the surface and incubated for
485 one hour. Non-adherent bacteria were eliminated by buffer washes. Finally, the
486 adherent bacteria were detached by pipetting several times directly onto the
487 immobilized liposomes with PBS pH 7.4. The collected samples were serially diluted
488 and plated on LB agar for viable bacterial counts. Averages and standard deviations
489 were calculated from six independent experiments.

490

491 **Data availability**

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/774588>. The copyright holder for this preprint (which was not peer-reviewed) is the author/funder. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

492 The data that support the findings of this study are available from the corresponding
493 authors upon request. The coordinates of the flagellin FljB have been deposited in the
494 RCSB PDB under accession numbers 6RGV.

495 References

496

497

- 498 1. Adler, J. & Templeton, B. The effect of environmental conditions on the motility of
499 *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **46**, 175-184 (1967).
- 500 2. Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L. & Zhu, G. Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic*
501 *Microbiol* **53**, 1-8 (2013).
- 502 3. Chaban, B., Hughes, H. V. & Beeby, M. The flagellum in bacterial pathogens: For
503 motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol* **46**, 91-103 (2015).
- 504 4. Rossez, Y., Wolfson, E. B., Holmes, A., Gally, D. L. & Holden, N. J. Bacterial
505 flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog* **11**, e1004483
506 (2015).
- 507 5. Tawk, C. et al. Stress-induced host membrane remodeling protects from infection
508 by non-motile bacterial pathogens. *EMBO J* **37**, (2018).
- 509 6. Lillehoj, E. P., Kim, B. T. & Kim, K. C. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*
510 flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**,
511 L751-6 (2002).
- 512 7. Girón, J. A., Torres, A. G., Freer, E. & Kaper, J. B. The flagella of enteropathogenic
513 *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**, 361-379
514 (2002).
- 515 8. Roy, K. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between
516 flagella and host cells. *Nature* **457**, 594-598 (2009).
- 517 9. Crawford, R. W., Reeve, K. E. & Gunn, J. S. Flagellated but not hyperfimbriated
518 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on
519 cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol* **192**, 2981-2990 (2010).
- 520 10. Rossez, Y. et al. Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of
521 pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants. *Environ Microbiol* **16**, 2181-
522 2195 (2014).
- 523 11. Feldman, M. et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*
524 pulmonary infection. *Infect Immun* **66**, 43-51 (1998).
- 525 12. Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I. & Prince, A. *Pseudomonas*
526 *aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like
527 receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 627-634
528 (2004).
- 529 13. Berg, H. C. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**, 19-54
530 (2003).
- 531 14. Aldridge, P. D. et al. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the
532 target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. *Proc Natl*
533 *Acad Sci U S A* **103**, 11340-11345 (2006).
- 534 15. Lederberg, J. & lino, T. Phase variation in *Salmonella*. *Genetics* **41**, 743 (1956).
- 535 16. Horstmann, J. A. et al. Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell
536 surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation. *Cell Microbiol* **19**,
537 e12739 (2017).

- 538 17. Samatey, F. A. et al. Structure of the bacterial flagellar protofilament and
539 implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**, 331-337 (2001).
- 540 18. De Maayer, P. & Cowan, D. A. Flashy flagella: flagellin modification is relatively
541 common and highly versatile among the Enterobacteriaceae. *BMC Genomics* **17**,
542 377 (2016).
- 543 19. Logan, S. M. Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire.
544 *Microbiology* **152**, 1249-1262 (2006).
- 545 20. Miller, W. L. et al. Flagellin glycosylation in *Pseudomonas aeruginosa* PAK
546 requires the O-antigen biosynthesis enzyme WbpO. *J Biol Chem* **283**, 3507-3518
547 (2008).
- 548 21. Szymanski, C. M., Logan, S. M., Linton, D. & Wren, B. W. *Campylobacter*--a tale of
549 two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol* **11**, 233-238 (2003).
- 550 22. Power, P. M. & Jennings, M. P. The genetics of glycosylation in Gram-negative
551 bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 211-222 (2003).
- 552 23. Merino, S. & Tomás, J. M. Gram-negative flagella glycosylation. *Int J Mol Sci* **15**,
553 2840-2857 (2014).
- 554 24. Stocker, B. A. D., McDonough, M. W. & Ambler, R. P. A Gene Determining
555 Presence or Absence of ϵ -N-Methyl-Lysine in *Salmonella* Flagellar Protein. *Nature*
556 **189**, 556-558 (1961).
- 557 25. Ambler, R. P. & Rees, M. W. Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein.
558 *Nature* **184**, 56-57 (1959).
- 559 26. Tronick, S. R. & Martinez, R. J. Methylation of the flagellin of *Salmonella*
560 *typhimurium*. *J Bacteriol* **105**, 211-219 (1971).
- 561 27. Frye, J. et al. Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar
562 Typhimurium. *J Bacteriol* **188**, 2233-2243 (2006).
- 563 28. Deditius, J. A. et al. Characterization of Novel Factors Involved in Swimming and
564 Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS One* **10**,
565 e0135351 (2015).
- 566 29. Kanto, S., Okino, H., Aizawa, S. & Yamaguchi, S. Amino acids responsible for
567 flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin. *J Mol Biol* **219**, 471-
568 480 (1991).
- 569 30. de Castro, E. et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and
570 ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids*
571 *Res* **34**, W362-5 (2006).
- 572 31. Kelly, G. et al. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from
573 enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**, 313-318 (1999).
- 574 32. Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R. & Bjorkman, P. J. Crystal structure
575 of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**, 291-295 (1999).
- 576 33. Luo, Y. et al. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor
577 complex. *Nature* **405**, 1073-1077 (2000).
- 578 34. Barthel, M. et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella*
579 *enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen
580 and host. *Infect Immun* **71**, 2839-2858 (2003).

- 581 35. Navabi, N., McGuckin, M. A. & Lindén, S. K. Gastrointestinal cell lines form
 582 polarized epithelia with an adherent mucus layer when cultured in semi-wet
 583 interfaces with mechanical stimulation. *PLoS One* **8**, e68761 (2013).
- 584 36. Maki-Yonekura, S., Yonekura, K. & Namba, K. Conformational change of flagellin
 585 for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 417-
 586 422 (2010).
- 587 37. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. Analysis of membrane and
 588 surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* **179**, 125-
 589 142 (1984).
- 590 38. Hanson, M. S. & Brinton, C. C. Identification and characterization of *E. coli* type-1
 591 pilus tip adhesion protein. *Nature* **332**, 265-268 (1988).
- 592 39. Ofek, I., Mirelman, D. & Sharon, N. Adherence of *Escherichia coli* to human
 593 mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* **265**, 623-625 (1977).
- 594 40. Duguid, J. P. & Campbell, I. Antigens of the type-1 fimbriae of *salmonellae* and
 595 other enterobacteria. *J Med Microbiol* **2**, 535-553 (1969).
- 596 41. Pratt, L. A. & Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles
 597 of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293 (1998).
- 598 42. Josenhans, C. & Suerbaum, S. The role of motility as a virulence factor in bacteria.
 599 *Int J Med Microbiol* **291**, 605-614 (2002).
- 600 43. Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. & Kolter, R. The outer membrane protein,
 601 antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol*
 602 *Microbiol* **37**, 424-432 (2000).
- 603 44. Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter, R. Exopolysaccharide production is required
 604 for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**,
 605 3593-3596 (2000).
- 606 45. Friedlander, R. S., Vogel, N. & Aizenberg, J. Role of Flagella in Adhesion of
 607 *Escherichia coli* to Abiotic Surfaces. *Langmuir* **31**, 6137-6144 (2015).
- 608 46. Bruzaud, J. et al. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of
 609 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces.
 610 *Colloids Surf B Biointerfaces* **131**, 59-66 (2015).
- 611 47. Friedlander, R. S. et al. Bacterial flagella explore microscale hummocks and
 612 hollows to increase adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5624-5629 (2013).
- 613 48. Bertani, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental
 614 systems. *J Bacteriol* **186**, 595-600 (2004).
- 615 49. Sanderson, K. E. & Roth, J. R. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, edition
 616 VII. *Microbiol Rev* **52**, 485-532 (1988).
- 617 50. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in
 618 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-
 619 6645 (2000).
- 620 51. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
- 621 52. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta*
 622 *Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132 (2004).

- 623 53. Brünger, A. T. et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for
624 macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**,
625 905-921 (1998).
- 626 54. Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast
627 protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*
628 **60**, 2256-2268 (2004).
- 629 55. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory
630 research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612 (2004).
- 631 56. Robert, X. & Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new
632 ENDscript server. *Nucleic Acids Res* **42**, W320-4 (2014).
- 633 57. Carvalho, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with
634 PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* **11**, 102-117 (2016).
- 635 58. Wozniak, C. E., Lee, C. & Hughes, K. T. T-POP array identifies EcnR and Pefl-
636 SrgD as novel regulators of flagellar gene expression. *J Bacteriol* **191**, 1498-1508
637 (2009).
- 638 59. Erhardt, M. Fluorescent Microscopy Techniques to Study Hook Length Control and
639 Flagella Formation. *Methods Mol Biol* **1593**, 37-46 (2017).
- 640 60. Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J. P., Gespach, C. & Kaiserlian, D. Immortalization
641 of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and
642 immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods* **166**, 63-73
643 (1993).
- 644 61. Kuehn, A. et al. Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model
645 the air-blood barrier. *ALTEX* **33**, 251-260 (2016).
- 646 62. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
647 PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
- 648 63. Hansmeier, N. et al. Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella*
649 *enterica* serotype Typhimurium. *Sci Rep* **7**, 10326 (2017).
- 650 64. Ibrahim, G. F., Fleet, G. H., Lyons, M. J. & Walker, R. A. Method for the isolation of
651 highly purified *Salmonella* flagellins. *J Clin Microbiol* **22**, 1040-1044 (1985).
- 652 65. Kato, A. & Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method
653 and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim Biophys Acta* **624**,
654 13-20 (1980).
- 655 66. Alizadeh-Pasdar, N. & Li-Chan, E. C. Comparison of protein surface
656 hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent
657 probes. *J Agric Food Chem* **48**, 328-334 (2000).
- 658 67. Weinberger, A. et al. Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys*
659 *J* **105**, 154-164 (2013).
- 660
661

662 **Acknowledgements**

663 We thank Heidi Landmesser, Nadine Körner, Henri Galez, Laurine Lemaire and Pauline
664 Adjadj for expert technical assistance, Juana de Diego and members of the Erhardt and
665 Kolbe labs for useful discussions and for critical comments on the manuscript and
666 Keichi Namba for providing providing the atomic model of the FliC flagellar filament. We
667 thank HZB for the allocation of synchrotron radiation beamtime and Uwe Müller for the
668 support at the beamline BL14.1, Petra Dersch for kindly providing plasmid pFU228,
669 Michael Hensel for providing P_{tet} -*fimA-F* mutant strains and Tobias May (InSCREENeX
670 GmbH) for help in tissue culture and providing the epithelial-like cell line CI11.

671

672 **Funding statement**

673 JAH acknowledges support by the President's Initiative and Networking Funds of the
674 Helmholtz Association of German Research Centers (HGF) under contract number VH-
675 GS-202. This work was supported in part by the Helmholtz Association Young
676 Investigator grant VH-NG-932 and the People Programme (Marie Curie Actions) of the
677 European Unions' Seventh Framework Programme grant 334030 (to ME). The
678 Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research (HIRI) supported this work with a
679 seed grant through funds from the Bavarian Ministry of Economic Affairs and Media,
680 Energy and Technology (Grant allocation nos. 0703/68674/5/2017 and
681 0703/89374/3/2017) (to ME and TS). MK, ML and CW were funded by the European
682 Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme
683 and through the President's Initiative and Networking Funds of the Helmholtz

684 Association of German Research Centers (HGF). The HGF further supported TS by
685 HGF impulse fund W2/W3-066. CU and JH acknowledge funding via Leibniz grant
686 SAW-2014-HPI-4. The Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental
687 Virology, is supported by the Freie und Hansestadt Hamburg and the
688 Bundesministerium für Gesundheit (BMG). HC acknowledges support by the French
689 Ministry of Higher Education, Research and Innovation. YR, CR, HC acknowledge
690 funding from the European Regional Development Fund ERDF and the Region of
691 Picardy (CPER 2007–2020).

692 The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to
693 publish, or preparation of the manuscript.

694

695 **Author contributions:** J.A.H., M.L., M.K. and M.E. conceived of the project,
696 designed the study, and wrote the paper; J.A.H., M.L, H.C., J.H. and C.K. performed the
697 experiments; J.A.H., M.L, H.C., J.H., C.K., C.U., G.A.G, Y.R., M.K. and M.E. analyzed
698 the data; P.S., S.S., C.R., R.K.L., C.W. and K.T.H. contributed to experiments and
699 performed strain construction; C.U., H.S., G.A.G., T.E.B.S., Y.R., M.K. and M.E.
700 contributed funding and resources.

701

702 **Competing interests**

703 The authors declare no competing interests.

704

705 **Figure legends**

706

707 **Fig. 1: Surface-exposed methylation of flagellin contributes to efficient**
708 **colonization of the murine intestine.** (a) Schematic of a methylated flagellar filament
709 and surface representation of the structure of FliC (top) and FliB (bottom). FliB-
710 dependent methylation sites are highlighted in orange. (b) Streptomycin pre-treated
711 C57BL/6 mice were infected with 10^7 CFU of the FliC-expressing WT (*fliC^{ON}*) and
712 isogenic Δ *fliB* mutant, each harboring a different antibiotic resistant cassette. The organ
713 burden (small intestine, colon and cecum lumen and tissue, respectively) was
714 determined two days post-infection and used to calculate the competitive indices (CI).
715 Each mouse is shown as an individual data point and significances were analyzed by
716 the Wilcoxon Signed Rank test. The bar graph represents the median of the data and
717 asterisks indicate a significantly different phenotype to the value 1 (* = $p < 0.05$).

718

719 **Fig. 2: Flagella methylation facilitates eukaryotic cell invasion.** (a) Schematic
720 illustration of productive adhesion and invasion of eukaryotic epithelial cells dependent
721 on methylated flagella. (b) Invasion of MODE-K murine epithelial cells depends on
722 methylated flagella. Reported are relative invasion rates of MODE-K epithelial cells for
723 various flagellin methylation mutants without (top: no spin) or with forced contact of the
724 bacteria by centrifugation (bottom: +spin). (c-e) Relative invasion rates of different
725 eukaryotic host cell types. The human epithelial cell line E12, the murine epithelial cell
726 line CI11, and the murine fibroblast cell line NIH 3T3 were infected with *Salmonella*
727 flagella methylation mutants as described above. The bar graphs represent the mean of
728 the reported relative invasion rate data normalized to the inoculum. Replicates are

729 shown as individual data points and statistical significances were determined by the
730 Student's *t* test (** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; ns = not significant).

731

732 **Fig. 3: Flagella methylation mediates adhesion to hydrophobic surfaces.** (a)

733 Methylation increases hydrophobicity of the flagellar filament outer surface. Surface
734 hydrophobicity distribution of the outer (left) and the inner surface (right) of the FliC
735 flagellar filament³⁶ according to the Eisenberg scale³⁷ (from green to white indicates

736 increasing hydrophobicity) with FliB-dependent methylation sites highlighted in blue. (b)

737 Measured surface hydrophobicity (S_o) of methylated and non-methylated ($\Delta fliB$)

738 flagellins using PRODAN on purified flagellar filaments. (c) Adhesion of *S. enterica* to

739 MODE-K epithelial cells is reduced in the absence of flagella methylation. Adhesion was

740 monitored using *S. enterica* strains deleted for *spi-1* in order to prevent invasion of the

741 eukaryotic host cells. (d) Adhesion of *S. enterica* to giant unilamellar vesicles (GUV)

742 consisting of phosphatidylcholine from egg chicken is dependent on the presence of

743 methylated flagella. Left: schematic illustration of the adhesion of *Salmonella* to GUVs

744 dependent on methylated flagella. Right: Quantified adhesion of *Salmonella* mutants to

745 GUVs. The bar graphs represent the mean of the reported data. Replicates are shown

746 as individual data points and statistical significances were determined by the Student's *t*

747 test (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; ns = not significant).

748