

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

Présentée par

Jean-Marie LACROIX

Sujet : Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) chez les entérobactéries : de la régulation osmotique à la virulence.

Soutenue le 20 juin 2006 devant le jury :

M. Joel MAZURIER, Président

M. Kaymeuang CAM

M. Jean-Claude LAZZARONI

M. Michel SIMONET

M. Jean-Pierre BOHIN

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Messieurs Cam, Lazzaroni, Mazurier et Simonet, membres du jury, d'avoir acceptés de prendre sur leur temps pour examiner ce manuscrit.

Merci à Brigitte et à Carmen qui ont corrigé ce document.

Merci à Jean-Pierre pour les longues et fréquentes discussions scientifiques, pédagogiques ou autres. Si elles n'ont pas toujours été sans éclats de voix, elles furent très souvent enrichissantes.

Merci à Brigitte, Michelle et Jacqueline pour m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) pendant toutes ces années.

Enfin merci à *E. coli* et *E. chrysanthemi* pour leur très involontaire collaboration à ces travaux.

PLAN

I/ INTRODUCTION	4
A/ La découverte des OPG chez <i>Escherichia coli</i>	4
B/ Les OPG d'<i>E. coli</i> et d'<i>Erwinia chrysanthemi</i>	5
II/ BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ LES ENTEROBACTERIES	6
A/ Le squelette	6
1/ Le locus <i>opgA</i> d' <i>E. coli</i>	7
2/ Le locus <i>opgGH</i> d' <i>E. chrysanthemi</i>	11
3/ Le locus <i>opgD</i> d' <i>E. coli</i>	13
B/ Les substitutions	15
1/ Le locus <i>opgB</i> d' <i>E. coli</i>	15
2/ Le locus <i>opgC</i> d' <i>E. coli</i>	17
C/ Conclusion	18
III/ REGULATION DE LA SYNTHÈSE DU SQUELETTE DES OPG	21
A/ Etude physiologique	21
B/ Etude génétique	23
C/ Conclusion	24
IV/ RÔLE DES OPG	25
A/ Phénotype des mutants <i>opg</i> chez <i>E. chrysanthemi</i>	25
B/ Recherche de suppresseurs chez <i>E. chrysanthemi</i>	27
C/ Analyse protéomique comparative chez <i>E. chrysanthemi</i>	31
D/ Conclusion	36
V/ PERSPECTIVE	38
A/ Relations OPG/RcsCBD	38
B/ Protéomique	38
C/ Recherche de nouveaux mutants	39
D/ Biosynthèse des OPG	39
VI/ BIBLIOGRAPHIE	41
VII/ ARTICLES COMPLETS	57

I/ INTRODUCTION

Toutes les cellules sont entourées d'une membrane séparant l'intérieur du milieu environnant. Divers constituants de ces membranes permettent un passage sélectif de diverses molécules nutritives, permettent la reconnaissance, l'adhésion ou l'interaction avec d'autres cellules ou avec des surfaces abiotiques. Ces membranes sont aussi le lieu où vont être perçus en premier les variations physico-chimiques de l'environnement qui seront ensuite transmises à l'intérieur de la cellule pour l'adaptation à ces nouvelles conditions. Chez les bactéries à Gram négatif, la cellule est entourée d'une enveloppe constituée de deux membranes, une membrane cellulaire et une membrane externe, séparées par un compartiment aqueux dénommé périplasme (Figure 1). Alors que la membrane cellulaire est une membrane classique comprenant des phospholipides et des protéines, la membrane externe possède en plus du LPS (lipopolysaccharide) constituant la couche externe de cette membrane. Celle-ci est plus rigide et moins perméable non seulement aux molécules hydrophiles de par sa partie lipidique mais également aux molécules hydrophobes de par sa partie glucidique exposée vers le milieu extérieur. Ainsi, chez ces bactéries, cette deuxième membrane assure une protection supplémentaire à la cellule. Le périplasme contient, outre de nombreuses protéines, le peptidoglycane permettant à la bactérie de résister aux différences de pression entre l'intérieur de la bactérie et le milieu extérieur. Des protéines structurent et assurent la cohésion de cette enveloppe. La transmission d'un signal va être compliquée par la présence de cette enveloppe complexe. On peut donc imaginer que le signal soit transmis jusqu'au cytoplasme de la bactérie par l'intermédiaire d'un relais de plusieurs molécules localisées à différents niveaux de cette enveloppe. C'est dans le périplasme de cette enveloppe que sont localisés les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Ce sont des oligosaccharides de taille intermédiaire, solubles, linéaires ou cycliques selon l'espèce considérée mais dont le squelette est uniquement constitué de molécules de glucose. Notre but est la compréhension du mécanisme de biosynthèse de ces glucanes, de leurs fonctions au sein de l'enveloppe et de la bactérie.

A/ La découverte des OPG chez *Escherichia coli*

Les OPG furent mis en évidence chez *E. coli* dans l'équipe d'E. P. Kennedy lors d'études sur le renouvellement des phospholipides. A la suite d'un marquage par du glycérol tritié, le tritium se retrouvait sur une molécule soluble. L'analyse de cette molécule montra

qu'il s'agissait de glucanes périplasmiques que Kennedy baptisa Mdo pour Membrane derived Oligosaccharides puisque la substitution par le phosphoglycérol provient des phospholipides membranaires. Lorsque la structure des glucanes de plusieurs autres espèces fut élucidée, on s'aperçut que cette substitution par des molécules d'origine membranaire n'était pas la règle. Par contre, la localisation périplasmique et l'osmorégulation (à de rares exceptions près) étaient des points communs à ces glucanes. J.-P. Bohin rebaptisa ces molécules Osmoregulated Periplasmic Glucans ou OPG.

B/ Les OPG d'*E. coli* et d'*Erwinia chrysanthemi*

Les structures de plusieurs espèces bactériennes appartenant aux classes des α , β , et γ Protéobactéries ont été élucidées. Sur la base de ces résultats, on peut classer les structures de ces glucanes en quatre familles (voir « Osmoregulation in the periplasm » situé en annexe VII). *E. coli* et *E. chrysanthemi* possèdent des OPG appartenant à la famille I comme *Pseudomonas syringae*. La structure du squelette glucidique des OPG de la famille I est voisine chez toutes ces espèces. Ce sont des molécules hétérogènes en taille allant de 5 à 12 résidus de glucose liés entre eux par des liaisons β -1,2 et branchés par des liaisons β -1,6. Divers substituants peuvent décorer ce squelette et de nombreux cas de figure existent. Chez *E. coli*, on note une substitution importante par du phosphoglycérol, des succinyles et dans une moindre mesure par de la phosphoéthanolamine. Par contre, chez *E. chrysanthemi*, on retrouve une faible substitution des OPG par des groupements acétyles et succinyles (51). Enfin, aucune substitution n'est retrouvée sur les glucanes de *P. syringae* (237).

II/ BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ LES ENTEROBACTERIES

A/ Le squelette

Chez *E. coli*, la découverte des OPG est le fruit d'un travail sur le renouvellement des phosphatidylglycérols membranaires. Aucun phénotype simple à mettre en œuvre n'existe, le seul moyen pour montrer la présence ou l'absence de ces OPG est donc leur dosage systématique dans chaque clone après qu'ils aient été extraits des cellules puis purifiés. Deux méthodes sont utilisées. La première tire parti du fait que les phosphoglycérols substituants les OPG d'*E. coli* proviennent des phosphatidylglycérols membranaires. Les cellules sont mises en croissance dans un milieu contenant du 2-³H glycérol qui permet le marquage spécifique des phospholipides. Le renouvellement de ces phospholipides aboutit au transfert de phosphoglycérol tritié sur les OPG. La présence ou l'absence de ceux-ci peut alors être révélée mais pas de manière quantitative puisque malheureusement le métabolisme du glycérol varie selon les souches. La deuxième méthode consiste à doser biochimiquement le glucose contenu dans les OPG après extraction et purification de ces OPG. Contrairement à la précédente, cette technique demande une importante quantité de cellules. Il était donc illusoire dans un temps raisonnable de vouloir isoler des mutants OPG dans ces conditions de crible car il serait alors nécessaire de tester plusieurs milliers de clones par une méthode ne permettant pas de doser plus de 96 clones par jour.

C'est donc uniquement grâce à l'isolement fortuit d'un mutant dépourvu d'OPG que l'analyse génétique pu enfin débiter. En effet, C. H. R. Raetz, lors d'études sur le métabolisme des phospholipides, constata qu'une des souches qu'il étudiait était dépourvue d'OPG. Cette souche, créée par G. Pluschke, possédait une mutation spontanée dans un locus codant une activité impliquée dans la biosynthèse des OPG. Le locus fut nommé *mdoA* (aujourd'hui *opgGH*) et la mutation *mdoA1* (*opgA1*) (5). Le mutant *opgA1* est également incapable d'effectuer l'élongation de chaînes linéaires de glucose en β -1,2 dans le test *in vitro* mis au point au même moment dans le laboratoire de Kennedy qui s'attachait à la caractérisation d'activités enzymatiques impliquées dans la synthèse des OPG (254). Ce test nécessite, outre une fraction membranaire sensible à la trypsine, possédant l'activité glucosyltransférase, une fraction soluble thermorésistante dont on montrera plus tard qu'il s'agit de l'ACP (Acyl Carrier Protein, connue alors pour son rôle dans le métabolisme des acides gras 242), un substrat l'UDP-glucose et un β -glucoside dont la fonction présumée

serait d'être une amorce. Ce test est très incomplet car non seulement le rendement est faible mais les molécules d'OPG obtenues sont plus longues que dans la cellule et elles sont linéaires, les molécules de glucose n'étant liées que par des liaisons β -1, 2. Il existe donc d'autres activités, inconnues et absentes de ce test, pour rendre compte de la biosynthèse et de la structure finale du squelette glucosidique des OPG. Néanmoins, ces résultats montrent que le locus *opgA* code tout ou partie de l'activité glucosyltransférase membranaire indispensable à la synthèse des OPG. Ce locus *opgA* a ensuite été cartographié dans le laboratoire de E. P. Kennedy par J.-P. Bohin (5). Cette cartographie exigera le dosage de plusieurs centaines de clones. Comme il s'agit d'un marqueur non sélectionnable, il a donc été nécessaire de rendre Hfr la souche originale *opgA1* puis de réaliser alors une série de conjugaisons dans différentes souches F^- contenant différentes auxotrophies réparties autour du chromosome. Après localisation de *opgA1* au voisinage de *pyrD*, sa localisation a été affinée par transduction généralisée pour être finalement établie à la 23^{ème} minute sur le chromosome entre *putA* (utilisation de proline comme seule source de carbone) et *pyrC* (biosynthèse de l'uracile) à 0,6 min et 0,2 min de ces deux marqueurs respectivement. Sur la base de ce travail, J.-P. Bohin isolera une mutation de manipulation plus aisée, *opgA200::Tn10*.

1/ Le locus *opgA* d'*E. coli*

Une partie du travail qui m'a alors été confié par J.-P. Bohin au début de ma thèse (Septembre 1985) était de cloner par complémentation ce locus *opgA*. Ce travail fait l'objet de l'article Lacroix et coll., 1989.

L'aboutissement de ce clonage, comme la cartographie décrite ci-dessus, va être fortement handicapée par l'absence de crible simple et la même méthodologie consistant en un dosage systématique des OPG de chaque clone recombinant va être utilisée. Cependant, bien que notre locus soit toujours un marqueur non sélectionnable, j'ai tiré parti de sa localisation à proximité des locus *pyrC* et *putA*. Les deux locus *opgA* et *pyrC* sont distants de 0,2 min ce qui correspond à environ 10kb de distance sur le chromosome alors que les deux locus *opgA* et *putA* sont distants de 0,6 min ce qui correspond à environ 30kb. Ainsi, vue la proximité des marqueurs, la démarche consistait à isoler un plasmide portant un insert d'ADN de taille supérieure à 10kb contenant à la fois les locus *pyrC*⁺ et *opgA*⁺ ou supérieur à 30 kb contenant à la fois les locus *putA*⁺ et *opgA*⁺. J'ai tiré parti de la banque de plasmides de Clarke et Carbon (48) dont les inserts ont une taille de 20 à 40 kb. Cette banque génomique d'*E. coli*, a été créée dans le plasmide Cole1. Ils sont conjugatifs et contiennent les gènes de résistance et d'immunité à la colicine E1. Les bactéries d'une souche *pyrC46*,

opgA200::Tn10, *putA* sont conjuguées avec 5 souches hébergeant les plasmides candidats. Les seules données portées à notre connaissance étaient que 2 des souches portaient des plasmides Pyr⁺ et 3 autres des plasmides Put⁺. Les transconjugants Pyr⁺ ou Put⁺ ont été sélectionnés soit sur des milieux dépourvus d'uracile, soit sur des milieux contenant de la proline comme seule source de carbone. Les OPG de plusieurs clones de chaque conjugaison sont alors dosés. L'un des plasmides portant le gène *pyrC*⁺ portait également le locus *opgA*⁺. Un premier sous clonage dans un plasmide à copies multiples a permis d'isoler un clone Opg⁺ (parmi 96 testés) qui amplifie d'un facteur 1,5 la biosynthèse des OPG. Il porte un plasmide avec un insert de 21,5kb (pNF201). De nombreux sous clonages successifs permirent de délimiter les bornes du fragment d'ADN nécessaire pour compléter les 2 mutations en notre possession (*opgA1* et *opgA200::Tn10*) et de réduire la taille de l'insert à 5kb suggérant fortement que plusieurs gènes se trouvaient à ce locus. Cependant, la complémentation, lorsqu'elle avait lieu, dépendait de l'orientation de l'insert par rapport au promoteur lactose du vecteur. Curieusement, la quantité d'OPG restait alors au niveau sauvage et n'était jamais amplifiée. Néanmoins, grâce à cette complémentation différente suivant l'orientation de l'insert je m'aperçu que je n'avais pas cloné la totalité du locus mais je savais quelle extrémité était incomplète. De manière surprenante, lors des clonages du locus similaire présent chez *Pseudomonas syringae* pathovar *Syringae* et chez *Erwinia chrysanthemi*, le même type d'évènement se produira (voir plus loin). Finalement le clonage de la totalité du locus fut obtenu en ajoutant un fragment de 3kb à l'extrémité du fragment précédent de 5kb. A 37°C, ce plasmide portant un insert de 8kb (pNF239) est mal toléré par les bactéries, conduit à la formation de très petites colonies et le plasmide est instable : il rend thermosensible les souches qui le portent alors que le fragment de 3kb seul ne rend pas les bactéries thermosensibles. Cette thermosensibilité ne sera jamais expliquée. Par contre à 30°C, la croissance est normale, le plasmide est stable et les bactéries possédant ce plasmide produisent 3 fois plus d'OPG que la souche sauvage sans modifier ni le taux de substitution par le phosphoglycérol ni la régulation par l'osmolarité du milieu. Enfin, un dernier sous clonage de ce plasmide de 8kb permet de délimiter définitivement le locus *opgA*. Il est contenu dans une séquence d'ADN de 5kb (pNF244) ayant les mêmes caractéristiques que le plasmide précédent à l'exception de la thermosensibilité. Nous découvrirons plus tard que le fragment de 3kb contient un gène impliqué dans la substitution des OPG par les succinyles (voir plus loin). Cependant, rien à ce moment du travail n'aurait pu nous permettre de mettre en évidence la nature de ce gène.

Parallèlement, j'ai localisé par Southern blot sur le chromosome l'insertion du transposon responsable de la mutation *opgA200::Tn10*. Il est localisé à moins d'1kb de l'une des extrémités de l'insert d'ADN minimum. Cette information servira pour élucider la structure génétique du locus *opgA* décrite ci-dessous.

La preuve génétique que le locus *opgA* contient plusieurs gènes a été apportée par Isabelle Loubens arrivée au laboratoire vers la fin de ma thèse (février 1989). Ce travail fait l'objet d'une partie de l'article Lacroix et coll., 1991.

Le transposon *opgA200::Tn10* étant localisé à proximité d'une extrémité du locus, il était alors intéressant de créer une seconde mutation à l'autre extrémité de ce locus. L'insertion d'une cassette *neo*, conférant la résistance à la kanamycine, a été créée *in vitro* à moins de 1kb de l'autre extrémité du locus. Cette nouvelle construction a été reportée sur le chromosome par génétique inverse. Les bactéries qui portent cette mutation ont un phénotype *Opg⁻* comparable aux 2 mutants déjà étudiés mais forment en plus des colonies muqueuses. Par contre, cette même mutation *neo* interrompant le locus *opgA* portée par un plasmide permet la complémentation des 2 mutations *opgA1* et *opgA200::Tn10* indiquant que *opgA* est composé d'au moins 2 gènes. Une mutagenèse du locus *opgA* sur plasmide par le transposon *Tn1000* a été réalisée. Le phénotype de 16 insertions réparties sur l'ensemble du locus a été analysé par une étude de complémentation des 3 mutations chromosomiques. Les résultats indiquent que le locus *opgA* est constitué de 2 gènes organisés en opéron *opgG* et *opgH*, que la mutation *neo* (*opgG202::neo*) interrompt *opgG* mais qu'elle n'est pas polaire. *opgG* est donc le premier gène de l'opéron et les mutations *opgA1* et *opgA200::Tn10* (désormais *opgH200::Tn10*) sont localisées dans *opgH*.

L'analyse de la séquence des 5 kb du locus, réalisée par Isabelle Loubens, permet de confirmer et de compléter ces résultats de génétique. Ce travail fait l'objet de l'article Loubens et coll., 1993.

Un site de fixation des ribosomes précède de 12 nucléotides le codon d'initiation de la traduction de *opgG*. La fin de la phase codante du gène *opgG* chevauche de 5 nucléotides le début de la phase codante du gène *opgH*. La transcription s'achève sur un terminateur intrinsèque de transcription. La protéine mature *OpgG* est une protéine soluble périplasmique de 56 kDa. Elle possède une séquence signal de 22 acides aminés typique d'une dépendance vis-à-vis du système Sec. Sa localisation périplasmique a été vérifiée à la fois par extraction spécifique des protéines du périplasma mais aussi par une fusion traductionnelle active *opgG-phoA* (la phosphatase alcaline *PhoA* n'est active que si elle est exportée dans le périplasma). *OpgG* était alors une protéine indispensable à la synthèse des OPG, dont la fonction restait

inconnue mais dont nous pensions qu'elle participait au branchement des molécules de glucose en β ,1-6. La détermination récente de sa structure tridimensionnelle (96) a permis de montrer une très forte similitude structurale avec plusieurs protéines impliquées dans la dégradation ou la synthèse de divers sucres chez plusieurs espèces. Elle est composée de deux domaines, le domaine amino terminal comprenant le site catalytique et le domaine carboxy terminal qui modulerait son activité. La mutagenèse dirigée modifiant différents acides aminés du site catalytique d'OpgG renforce l'idée que celle-ci est responsable du branchement alors que la délétion de la majeure partie de la partie C-terminale semble diminuer la vitesse de synthèse (Thèse du laboratoire d'Eglantine Rollet). La protéine OpgH est une protéine de 97 kDa, Son caractère membranaire, suggéré par le test d'élongation *in vitro* et transmembranaire suggéré par son profil d'hydrophobie, a été démontré par des fusions traductionnelles *opgH-blaM*. Le gène *blaM* code une β -lactamase périplasmique. Cette enzyme ne protège donc les bactéries efficacement, donc individuellement, contre les pénicillines que si elle a une localisation périplasmique. Par contre, si la β -lactamase reste cytoplasmique, les cellules ne seront protégées qu'en amas, la lyse d'une partie des bactéries de l'amas libérant la β -lactamase dans le milieu, protégeant alors les bactéries n'ayant pas encore été lysées. Les constructions conduisant à une résistance en amas sont fusionnées sur une partie cytoplasmique de la protéine alors que les constructions conduisant à une résistance en colonies isolées sont fusionnées sur une partie périplasmique de la protéine. La grande variation de résistance à l'ampicilline observée pour les différentes fusions démontre la localisation transmembranaire de cette protéine. Ultérieurement, de nombreuses fusions le long de OpgH seront créées par L. Debarbieux au laboratoire pour montrer qu'OpgH est constituée de huit segments transmembranaires (64) qui pourraient former un canal permettant le passage à travers la membrane des OPG. La synthèse des OPG serait catalysée par la grande boucle cytoplasmique d'OpgH comprise entre le deuxième et le troisième segment transmembranaire.

L'élément nouveau qui va donner une nouvelle orientation à une partie des recherches du laboratoire résulte de l'analyse de la séquence de *opgGH*. Elle va conduire à la découverte d'une forte identité (supérieure à 70%) entre les protéines codées par les locus *opgGH* d'*E. coli* et le locus *hrpM* de *Pseudomonas syringae* pathovar *Syringae*. Par comparaison, l'identité entre les protéines de biosynthèse du tryptophane de ces 2 organismes ne dépasse pas 54% et se situe le plus souvent autour de 35%. Cette γ -Protéobactérie contient des OPG, qui bien que non substitués, possèdent un squelette linéaire branché de structure très voisine à

ceux d'*E. coli* (voir introduction). Par contre, il n'existe pas de similitude avec les protéines catalysant la biosynthèse des OPG au squelette cyclique des α -Protéobactéries comme les Rhizobiacées. Chez ces espèces, le système de biosynthèse est très différent puisqu'il consiste en deux protéines membranaires. La première, de masse supérieure à 300kDa, catalyse l'élongation et la cyclisation des glucanes. La seconde, de masse inférieure à 100kDa, et possédant une activité ATPase, est nécessaire au transport des glucanes vers le périplasme (30). Les mutants *hrpM* sont non virulents chez la plante hôte le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et ne provoquent plus la réponse hypersensible chez les plantes non hôtes comme le tabac (*Nicotiana tabacum*) (183). Indépendamment, d'autres auteurs montraient que l'absence d'OPG (appelés glucanes cycliques) chez *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum* (Rhizobiacées) provoque respectivement une perte de virulence ou un défaut de symbiose (formation de nodules vides de bactéroïdes) chez les plantes hôtes (71, 89, 74). Par contre, les mêmes études menées chez *Shigella flexneri* ne montrent aucune différence de virulence du mutant et du sauvage dans le développement de la kératoconjonctivite chez le cobaye (observations du laboratoire non publiées). Néanmoins, les cellules cibles de ce test sont assez différentes de celles naturellement infectées par les bactéries du genre *Shigella*. Puisque les OPG, quelle que soit la structure de leur squelette, semblent impliqués dans la virulence ou la symbiose de bactéries interagissant avec des végétaux, les études sur les OPG ne pouvaient pas se poursuivre sans étudier leur rôle dans la virulence de bactéries phytopathogènes. Le choix s'est porté sur une Entérobactérie, *Erwinia chrysanthemi*. C'est une entérobactérie phytopathogène à large spectre d'hôtes responsable de la maladie qualifiée de pourriture molle. Elle possède les avantages suivants. Des outils génétiques et moléculaires voisins de ceux d'*E. coli* existent (conjugaison, transduction, transformation, génétique inverse). La complémentation fonctionnelle hétérologue est possible autorisant le clonage des gènes d'*E. chrysanthemi* chez *E. coli*. Les modèles d'étude de la pathogénie sont des végétaux peu onéreux et d'utilisation faciles : le tubercule de pomme de terre, la feuille d'endive et le *Saintpaulia ionantha*.

2/ Le locus *opgGH* d'*E. chrysanthemi*

Le travail a été effectué par Frédéric Page que j'ai co-encadré et a fait l'objet d'une partie de l'article Page et coll., 2001. Nous avons tout d'abord réalisé un clonage par complémentation hétérologue du mutant *opgH200::Tn10* d'*E. coli* par un plasmide portant les gènes homologues d'*E. chrysanthemi*. Plusieurs indications permettaient de penser que cette complémentation était possible. 1/ Les deux espèces, des Entérobactéries, sont

phylogéniquement très proches. 2/ La conjugaison interspécifique s'effectue en routine. 3/ Le plasmide contenant le locus *hrpM* de *P. syringae* pathovar *Syringae*, espèce plus éloignée d'*E. coli* qu'*E. chrysanthemi*, complémente la mutation *opgH200::Tn10*. 4/ La structure des OPG d'*E. chrysanthemi* (voir introduction), en cours d'analyse au même moment au laboratoire, indiquait des OPG au squelette glucosidique très voisin de celui déjà observée chez *E. coli* et *P. syringae* pathovar *Syringae*. Nous pouvions donc nous attendre à une forte similitude structurale et surtout fonctionnelle entre les protéines impliquées dans la synthèse du squelette des deux bactéries.

Malheureusement, il n'existait toujours pas de crible facilement manipulable pour déterminer le phénotype Opg. C'est pourquoi, nous avons décidé de réutiliser une stratégie similaire à celle qui nous avait permis de cloner *opgGH* chez *E. coli* c'est-à-dire en tirant partie de la proximité de *pyrC* d'*E. coli* distant de 13kb du locus *opgGH* et en espérant une organisation similaire de cette région chromosomique chez *E. chrysanthemi*. En effet, en dépit de quelques réarrangements chromosomiques, l'organisation génétique de plusieurs régions du chromosome d'*E. chrysanthemi* est pratiquement identique à celle d'*E. coli*. A partir d'un RP4::mini-Mu, nous avons fabriqué des plasmides R-prime contenant un fragment d'ADN chromosomique chez *E. chrysanthemi*. La conjugaison de ces bactéries avec une souche d'*E. coli* (*pyrC*, *opgH200::Tn10*) permit la sélection de 12 transconjugants Pyr⁺. Quatre de ces transconjugants portaient un plasmide avec un insert de taille supérieure à 13kb (15kb à 44kb) et seuls les clones portant ces plasmides furent analysés pour leur phénotype Opg. L'un des R-prime (R24) complémente la mutation *opgH* et augmente même la synthèse des OPG d'un facteur 1.5. Les sous clonages dans un plasmide à copies multiples qui suivirent permirent d'isoler un plasmide (pNFW3, insert 9,5kb) complémentant la mutation *opgH* mais à un niveau seulement identique au sauvage, laissant penser que la transcription se faisait à partir du promoteur *lac* du vecteur et que nous ne possédions pas la totalité de l'opéron comme cela s'était produit lors du clonage du locus *opgGH* d'*E. coli*. Les séquences des deux bornes de l'insert furent donc séquencées. Celle jouxtant le promoteur *lac* du vecteur présentait une très forte similarité avec le début de la phase codante de *opgG* (le début de l'insert correspondant à l'acide aminé 72). Il nous manquait donc le début de l'opéron. Pour restaurer une version complète de l'opéron, un fragment d'ADN (3,3kb) du R-prime chevauchant l'insert de pNFW3 a été détecté par Southern blot grâce au fragment d'ADN de l'insert de pNFW3 utilisé comme sonde. L'introduction dans une souche *opgG* d'*E. coli* d'un plasmide contenant ce fragment d'ADN, pNFW27, conduit à un phénotype Opg⁺. L'utilisation de parties des inserts des plasmides pNFW3 et pNFW27 ont conduit à l'obtention du plasmide pNFW32

(insert 6,4kb) contenant la totalité de l'opéron, complétant les mutations *opgG* et *opgH* d'*E. coli* et amplifiant d'un facteur deux la quantité d'OPG des souches l'hébergeant.

La totalité de la séquence du locus fut alors déterminée. Elle permit de montrer une organisation génétique identique à celle rencontrée chez *E. coli* mais également une très forte identité des protéines codées par ces deux locus. En effet, l'opéron est constitué de deux gènes, *opgG* et *opgH*. La fin de la phase codante de *opgG* chevauche le début de la phase codante de *opgH*, les séquences des promoteurs des deux locus *opgGH* d'*E. coli* et *E. chrysanthemi* sont identiques à l'exception d'un nucléotide au niveau du -10 et ces opérons sont terminés par un terminateur intrinsèque de transcription. De plus, les alignements entre les deux protéines OpgG montrent 75,5% d'identité et 87,5% de similarité et ceux entre les deux protéines OpgH montrent 74,7% d'identité et 85,8% de similarité. L'interruption de chacun des deux gènes fut obtenue *in vitro* par l'insertion d'une cassette *uidA-Kan*. Chacune de ces deux constructions fut reportée par génétique inverse sur le chromosome d'*E. chrysanthemi*. Là encore, comme chez *E. coli*, la synthèse des OPG est totalement abolie chez les mutants de chacun des 2 gènes.

3/ Le locus *opgD* d'*E. coli*

Le travail a été effectué par Yannick Lequette que j'ai co-encadré et a fait l'objet de l'article Lequette et coll., 2004. La recherche, par J.-P. Bohin, de séquences présentant des similitudes avec OpgG a révélé l'existence d'un paralogue potentiel de *opgG*, *ydcG*. Ce gène a été rebaptisé *opgD*. OpgD et OpgG présentent une identité de 39% et une similitude de 64%. Link (147), dans son analyse protéomique, a montré que OpgD, est une protéine périplasmique abondante en phase stationnaire dans un milieu riche. OpgG présente un peptide signal dépendant de la voie générale de sécrétion Sec, OpgD se distingue d'OpgG par un peptide signal de 32 acides aminés possédant la séquence consensus XRRXFLK typique du système de sécrétion Tat. Elle ferait donc partie de la petite famille de 23 protéines empruntant cette voie de translocation chez *E. coli*. Le rôle de OpgD a été abordé par l'étude d'un mutant obtenu par génétique inverse après clonage de *opgD* dans un plasmide, et insertion d'une cassette portant la résistance au chloramphénicol. On extrait une quantité normale d'OPG d'une souche *opgD*, OpgD n'a donc pas la même fonction que OpgG. Par contre, le pic correspondant à ces OPG est élué sept fractions plus tôt sur colonne de filtration sur gel (P4) que les OPG de la souche sauvage suggérant une augmentation de la taille de ces OPG. L'analyse en chromatographie d'affinité (DEAE pH 7,4) montre une forte perturbation du profil d'éluion. Les OPG de la souche sauvage sont élués en cinq fractions discrètes,

chacune de ces fractions représente un rapport charge/masse différent à la fois par l'hétérogénéité de la taille du squelette et par l'hétérogénéité du nombre et de la nature des substituants présents sur chaque molécule d'OPG. Les OPG de la souche *opgD* ont un profil d'élution perturbé indiquant une modification du rapport charge/masse des OPG du mutant. L'analyse en spectrométrie de masse du squelette montre que les OPG du mutant sont composés de molécules de 6 à 23 résidus glucose (moyenne 11 à 12) contre 6 à 13 (moyenne 8 à 9) pour les OPG du sauvage. De plus, les analyses après méthanolyse indiquent que les OPG du mutant sont moins branchés que ceux du sauvage et présentent donc un allongement de la chaîne linéaire des glucoses liés en β , 1-2. Ainsi, OpgD est impliquée dans le contrôle de la taille et de la structure du squelette glucosidique des OPG mais ne pas participer directement à la catalyse des OPG. La translocation de OpgD par la voie de sécrétion Tat a été vérifiée en regardant le profil d'élution par chromatographie d'affinité des OPG dans un contexte *tatB* (gène indispensable au système de translocation Tat) d'une part et après modification de la séquence signal à deux arginines de *opgD* (RR en KK et RX en KK) d'autre part. Dans les trois cas, le profil d'élution est fortement perturbé démontrant la sécrétion de OpgD par le système Tat.

Chez *E. coli*, le rôle de OpgD, mais également sa régulation, semblent plus complexes que celui décrit précédemment. En effet, le promoteur est compris dans les 87pb en amont de l'initiation de la transcription. Ce promoteur possède un C à la position -13 indiquant une dépendance vis-à-vis de σ^s (81) mais également des séquences -10 et -35 d'un bon promoteur à σ^{70} . En phase stationnaire, la forte expression de *opgD* dépend dans un premier temps exclusivement de σ^s . Cette expression n'a besoin que du promoteur compris dans les 87pb. Cette expression dépend, dans un deuxième temps, de σ^{70} mais alors *opgD* n'est exprimé que si plus de 1 kb est présent en amont du site d'initiation de transcription. De même, la faible expression de *opgD* en phase exponentielle ne dépend que de σ^{70} et nécessite également la présence de cette longue séquence amont. Ainsi, alors que la synthèse des OPG est achevée en phase stationnaire, la synthèse d'OpgD augmente considérablement. De plus, lorsque *opgD* n'est transcrit qu'en phase stationnaire (promoteur minimal) par σ^s , les OPG produits présentent un phénotype *opgD* suggérant fortement que OpgD ne contrôle la taille des OPG qu'en phase exponentielle lorsque ceux-ci sont en cours de synthèse et qu'une fois leur synthèse achevée, il est alors impossible de remanier leur structure. D'ailleurs, la structure des OPG est identique en phase stationnaire et en phase exponentielle chez le sauvage. Il en est de même chez le mutant *opgD* où l'altération de la structure est identique quelle que soit la phase

de croissance. De plus, la complémentation de la mutation *opgD* par un plasmide à copie multiples portant le gène *opgD*⁺ permet de retrouver un profil d'élution en chromatographie d'affinité proche mais non identique à celui du sauvage suggérant une importance du contrôle de l'abondance de OpgD. Ces résultats tendent à conforter l'hypothèse selon laquelle les enzymes de biosynthèse des OPG fonctionnent en complexe.

B/ Les substitutions

Malgré la diversité et l'hétérogénéité du nombre et de la nature des substituants révélée par la détermination de la structure des OPG de plusieurs espèces de bactéries à Gram négatif, peu de gènes de substitution ont été recherchés. A ce jour, seuls deux gènes de substitution des phosphoglycérols, l'un chez *E. coli* (voir ci-dessous) et l'autre chez *Sinorhizobium meliloti* (31) et deux gènes de substitution des succinyles, l'un chez *Rhodobacter sphaeroïdes* (50) et l'autre chez *E. coli* (voir ci-dessous) ont été caractérisés. Là encore, la difficulté réside dans la mise au point de cribles efficaces. On pourra noter que dans tous les cas, ce sont des substituants anioniques dont les gènes ont été isolés et c'est cette caractéristique qui sera à l'origine des cribles utilisés dans trois des quatre gènes isolés.

1/ Le locus *opgB* d'*E. coli*

Ce travail a été réalisé par E. Lanfroy et Yannick Lequette.

Deux activités catalysant la substitution du phosphoglycérol ont été caractérisées. La première à avoir été mise en évidence est la phosphoglycérol transférase II, enzyme soluble périplasmique estimée à 56 kDa par filtration sur gel (91). *In vitro*, elle catalyse le transfert de phosphoglycérol provenant d'OPG substitués sur des OPG non substitués, sur divers β -glucosides et libère du phosphoglycérol cyclique en absence ou à trop faible concentration d'accepteur. Elle est néanmoins incapable de transférer du phosphoglycérol sur les OPG à partir de phosphatidylglycérol membranaire. Ce rôle est dévolu à la phosphoglycérol transférase I qui possède son activité liée à la membrane. Cette dernière est également capable, *in vitro* comme *in vivo*, de transférer le phosphoglycérol des phosphatidylglycérols membranaires sur des divers β -glucosides accepteurs artificiels tels que l'arbutine. Puisque cette arbutine est incapable de traverser la membrane cellulaire, la partie catalytique de cette enzyme est située sur la face périplasmique (6). Ainsi, le transfert primaire de phosphoglycérol se ferait du phosphatidylglycérol sur les molécules d'OPG néosynthétisées par phosphoglycérol transférase I puis ces substituants seraient échangés entre molécules

d'OPG par la phosphoglycérol transférase II. Le gène *opgB*, codant la phosphoglycérol transférase I a été isolé par J.-P. Bohin suite à une mutagenèse par transposon (117). Cette enzyme, transfère le phosphoglycérol du phosphatidylglycérol membranaire sur les OPG mais également et de manière plus efficace sur l'arbutine. Ce transfert conduit à la formation de diacylglycérol qui est toxique pour la cellule s'il n'est pas rapidement phosphorylé par la diacylglycérol kinase (codée par *dgk*) en acide phosphatidique. Ainsi, en présence d'arbutine dans un mutant *dgk* l'accumulation de diacylglycérol augmente et conduit à un arrêt de la croissance. Les mutants *opgB* furent isolés dans ce contexte *dgk* puisque alors la suraccumulation de diacylglycérol n'a plus lieu. Alors que les OPG de mutants *opgB* sont dépourvus de phosphoglycérol, un extrait cellulaire brut de ces mêmes souches possède encore la capacité de retirer le phosphoglycérol des OPG sauvages.

Le clonage par complémentation et la séquence de *opgB* fut obtenu par E. Lanfroy au laboratoire (142). OpgB est une protéine de 84 kDa comprenant 750 acides aminés. Le profil d'hydrophobie prédit la présence de 3 segments transmembranaires dans les 111 premiers acides aminés suivie d'une partie soluble constituée du reste de la protéine. Les quatre résidus arginine localisés entre les segments transmembranaires 2 et 3 suggèrent fortement que cette partie est localisée du côté cytoplasmique et que donc la partie soluble est localisée du côté périplasmique. Ce profil est en accord avec la localisation déterminée par les études biochimiques antérieures et d'après ces mêmes études biochimiques, on peut donc penser que la partie soluble périplasmique porte l'activité catalytique. E. Lanfroy s'attacha alors à valider expérimentalement ce modèle. Il utilisa la technique se servant de la β -lactamase comme rapporteur, méthode déjà décrite pour topographier OpgH d'*E. coli* (voir plus haut). 23 fusions *opgB-blaM* exprimant la β -lactamase furent obtenues après digestion à l'exonucléase III, toutes localisées entre les acides aminés 151 à 750. Toutes confèrent une résistance à l'ampicilline en colonie isolée confirmant la localisation périplasmique de la partie soluble d'OpgB. Le point de fusion de dix de ces fusions, régulièrement espacées le long de la protéine OpgB, fut alors déterminé. Deux fusions *opgB-blaM* supplémentaires furent créées directement sur site de restriction après les acides aminés 28 (fin du premier segment transmembranaire) et 84 (fin du deuxième segment transmembranaire) afin de couvrir la totalité de la protéine. La β -lactamase de la première fusion est périplasmique alors que celle de la deuxième est cytoplasmique confirmant ainsi la topographie prédite par le profil d'hydrophobie. La confirmation de la localisation membranaire de ces 12 fusions fut alors abordée par la mesure de leur activité β -lactamase. Comme prévu, plus de 80% de l'activité

des 2 protéines fusion créées sur site de restriction est liée à la membrane. Par contre et contre toute attente, plus de 70% de l'activité des 10 autres protéines fusion est retrouvée dans la fraction soluble. Ces études suggèrent un clivage d'OpgB. La visualisation de ce clivage a été réalisée après marquage spécifique d'OpgB après clonage de *opgB* sous la dépendance du promoteur de T7. En effet, cinq bandes spécifiques peuvent être repérées. La première d'une masse estimée à 84 kDa correspondrait à OpgB. La deuxième, d'une masse estimée à 72 kDa, pourrait correspondre à la partie soluble clivée juste après le troisième segment transmembranaire. Cette hypothèse est étayée par l'existence d'un site de clivage dépendant de Lep (signal peptidase clivant le peptide signal des protéines sécrétées par la voie générale de sécrétion) entre les acides aminés 111 et 112. Les trois autres bandes observées seraient des produits de dégradation de la bande de 72 kDa. Cependant, l'une d'entre elle, d'une masse estimée à 47 kDa, correspond à une masse voisine de celle de la phosphoglycérol transférase II (estimée à 56 kDa). Ainsi, *opgB* pourrait coder à la fois la phosphoglycérol transférase I et la II après clivage de la première. L'activité phosphoglycérol transférase II a donc été mesurée à partir d'extraits périplasmiques grâce à son activité cyclase libérant du phosphoglycérol cyclique à partir des OPG substitués. Aucune activité n'a été détectée dans une souche *opgB* alors qu'une activité est détectée dans la souche sauvage. De plus, dans une souche portant *opgB* sur un plasmide à copie multiple, cette activité est augmentée d'un facteur sept à huit. Ainsi, les deux phosphoglycérol transférases sont bien les produits d'un même gène. L'activité phosphoglycérol transférase retrouvée dans les mutants *opgB* (117) doit être une activité cytoplasmique parasite sans rapport avec la substitution des OPG puisque l'activité avait alors été mesurée sur un extrait cellulaire total et non sur un extrait périplasmique.

2/ Le locus *opgC* d'*E. coli*

Ce travail a fait l'objet de l'article Lacroix et coll., 1999.

Les OPG d'*E. coli* doivent leur caractère anionique à la substitution à la fois par le phosphoglycérol et par le succinate. L'isolement du gène codant la succinyle transférase a été obtenu en utilisant comme crible la technique de chromatographie en couche mince développée par Breedveld (31) pour l'isolement de mutants dépourvus de phosphoglycérol transférase chez *S. meliloti*. En effet, il avait développé cette méthode puisque la méthode à l'arbutine utilisée chez *E. coli* pour l'isolement de *opgB* s'était révélée inefficace chez *S. meliloti*. Cette technique est basée sur une migration différentielle sur couche mince d'OPG anioniques et d'OPG neutres ou peu anioniques. Nous avons utilisé une souche *opgB* dans

laquelle la nature anionique des OPG n'est conférée que par les résidus succinyles. Dans cette souche, les OPG désués (donc désués) par un traitement alcalin ont une migration fortement réduite (dans une solution butanol, éthanol, eau 5:5:4) par rapport aux OPG non traités validant ainsi la technique pour l'isolement de mutants de succinylation chez *E. coli*. 996 mutants d'insertion Tn5 ont alors été criblés par cette technique. Les OPG de l'un des clones testés ont un retard de migration similaire à ceux d'une souche *opgB* dont les OPG ont été désués par traitement alcalin. Les OPG de la souche portant cette mutation, *opgC*, ont un squelette contenant une quantité de glucose identique aux OPG de la souche sauvage alors qu'aucun groupe succinyle ne peut être détecté chez le mutant après traitement alcalin des OPG. Une chromatographie d'échange d'anions a confirmé l'absence de charges négatives sur les OPG du mutant *opgB*, *opgC*. Ces mutants ont permis une étude plus fine sur la répartition des charges sur les OPG par cette méthode d'analyse en chromatographie d'échange d'anions. Elle montre que l'hétérogénéité des OPG est non seulement conférée par la taille des molécules du squelette mais qu'elle est encore augmentée par une répartition non homogène des divers substituants sur chaque type de molécule. La mutation *opgC* a été clonée grâce à la résistance portée par le transposon responsable de cette mutation. La séquence du pied du transposon suivie de la jonction avec le chromosome a montré, après comparaison de cette séquence avec celle du génome d'*E. coli*, que le gène *opgC* était le gène juste en amont de l'opéron *opgGH*. Ce gène est complètement inclus dans le fragment de 3 kb utilisé pour reconstituer la totalité de l'opéron *opgGH* au sein de pNF239 (voir plus haut). Le plasmide contenant ce fragment de 3kb complète la mutation *opgC*. Ce gène est transcrit en direction opposée à *opgGH*, n'est pas organisé en opéron car il s'achève par un terminateur intrinsèque de transcription. *opgC* code une protéine de 385 acides aminés qui posséderait dix segments transmembranaires. OpgC serait une protéine transmembranaire catalysant le transfert et la translocation à travers la membrane cytoplasmique des résidus succinyles à partir du succinyl-coenzyme A cytoplasmique vers les OPG situés sur la face périplasmique.

C/ Conclusion

Les molécules substituant les OPG sont très variables selon les espèces et leurs gènes ne présentent aucune similitude entre eux même lorsqu'ils catalysent la substitution de la même molécule. Il est donc très difficile de rechercher *in silico* des gènes candidats potentiels impliqués dans la substitution. De même, on peut se demander si ces substituants (variant selon les espèces de 0 à 3 molécules différentes) sont impliqués dans le rôle biologique des

OPG. Si on se cantonne à nos deux bactéries modèles, il nous reste à isoler les gènes catalysant le transfert des groupements succinyles et acétyles chez *E. chrysanthemi* et phosphoéthanolamine chez *E. coli*. Par contre, les gènes gouvernant la synthèse du squelette sont conservés et cette conservation respecte en général l'arbre phylogénique. Par contre, la ou les fonctions de OpgG et OpgD ne sont encore que partiellement comprises de même que la ou les raisons de leur présence ou absence chez les espèces étudiées. Il est donc tentant de penser que la synthèse du squelette des OPG linéaires branchés est uniquement gouvernée par les produits de deux ou trois gènes selon les espèces : *opgH*, accompagné d'*opgG* et/ou *opgD*. On peut se demander si les fonctions de OpgG et de OpgD sont les mêmes chez toutes les espèces. Lorsqu'un seul des deux gènes est présent, la protéine produite pourrait cumuler les fonctions des deux protéines ou conserver sa fonction. Dans ce deuxième cas, OpgH prendrait en charge la fonction de la protéine absente. Chez *Xylella fastidiosa*, OpgG n'existe pas mais OpgD semble conserver sa fonction puisque l'expression chez *E. coli* de OpgD de *X. fastidiosa* complémente l'absence de la protéine OpgD indigène plaidant ainsi en faveur de la conservation de fonction. OpgH pourrait aussi catalyser seule la totalité de la synthèse du squelette, OpgG et/ou OpgD n'assurant qu'une fonction modulatrice. L'hypothèse d'un nombre très limité de gènes impliqués dans la synthèse du squelette avait déjà été suggérée depuis plus de dix ans par la recherche de nouveaux mutants dépourvus d'OPG chez *E. coli*. Cette recherche a été réalisée dans un contexte *dgk* déjà utilisé pour isoler les mutants *opgB* (voir plus haut) En effet, la culture de bactéries *dgk* dans un milieu de très basse osmolarité doit favoriser la croissance de tout mutant Opg⁻ abolissant le transfert de phosphoglycérol sur ces OPG. Après mutagenèse chimique et étalement sur milieu solide de très basse osmolarité, de nombreux mutants furent obtenus. Tous les mutants analysés furent localisés ou dans le gène *opgH* ou dans le gène *galU*, dont le produit catalyse la formation de l'UDP-glucose. Ces résultats furent obtenus indépendamment dans le laboratoire de E. P. Kennedy (255) et dans le notre suggérant donc que seuls l'opéron *opgGH* est impliqué dans la formation du squelette des OPG. De manière surprenante, aucun mutant *opgB* ne fut isolé alors qu'un tel mutant aurait aboli le transfert de phosphoglycérol aussi efficacement que les mutants *opgH* ou *galU*. Curieusement, cette méthode d'enrichissement est totalement inefficace en milieu liquide. De plus, les souches *dgk* dépourvues d'OPG ne voient pas leur taux de diacylglycérol varier par rapport à la souche *dgk* seule car le taux de renouvellement du phosphatidylglycérol ne varie pas. Ainsi, contrairement à ce qui se passe en présence d'arbutine, la base de l'enrichissement n'est pas la baisse de la concentration du diacylglycérol dans les mutants Opg⁻ sinon des

mutants *opgB* auraient été isolés. La base de l'enrichissement est inconnue mais tout ce passe comme si l'absence d'OPG agissait comme un supprimeur de la mutation *dgk*.

III/ REGULATION DE LA SYNTHÈSE DU SQUELETTE DES OPG

Une partie de ce travail fait partie de l'article n°2.

L'étude de la régulation osmotique a été entreprise de deux manières complémentaires et uniquement chez *E. coli* dans notre laboratoire. Chez les quelques espèces où cette régulation osmotique a été étudiée, aucun schéma général ne peut être dressé. Selon l'espèce, on peut y observer une régulation génétique et/ou une adaptation enzymatique (voir le chapitre « osmoregulation in the periplasm » situé en annexe VII).

A/ Etude physiologique

J'ai réalisée cette étude dans une souche d'*E. coli* incapable de synthétiser ou de dégrader le glucose (*pgi*, *zwf*) mais qui peut synthétiser de l'UDP-glucose et donc des OPG si du glucose est ajouté dans le milieu. Pour avoir accès au taux de synthèse, les bactéries sont cultivées dans un milieu dépourvu de glucose. A divers temps, une fraction de la culture est prélevée, du glucose marqué est ajouté durant dix minutes puis le marquage est arrêté par du TCA et les OPG sont extraits et quantifiés. Le taux de synthèse mesuré (3 nmoles de glc/mn/mg de poids sec) à basse osmolarité¹ (70 mosM) chute d'un facteur cinq (0,6 nmoles de glc/mn/mg poids sec) à haute osmolarité (670 mosM). Il reste constant au cours de la phase exponentielle pour un nombre de bactéries donné puis chute brutalement environ deux heures après l'entrée en phase stationnaire pour devenir nul. Ceci suggère une régulation en fonction de la phase de croissance par un arrêt de la synthèse d'au moins une protéine du système. L'implication de deux régulateurs globaux et d'un facteur sigma participant à la régulation osmotique et/ou dépendante de la phase de croissance de nombreux gènes a été testée. Des mutants de *osmZ*, codant H-NS, protéine associée au nucléoïde dont l'abondance varie en fonction de la phase de croissance et de l'osmolarité, de *himD*, gène codant l'une des deux sous unités de IHF (integration host factor) et de *rpoS*, codant σ^S fortement induit en phase stationnaire et dans toute situation où la vitesse de croissance est ralentie ont été introduits dans la souche *pgi*, *zwf*. Aucune d'entre elles n'affecte le taux de synthèse des OPG. Bien que cette souche produise une quantité d'OPG identique à celle d'une souche sauvage (90 et 15 nmoles glc/mg poids sec à 70 et 670 mosM respectivement), le taux de synthèse mesuré est trois fois supérieur à celui qui serait nécessaire. Ainsi, lorsque la quantité d'OPG optimale est atteinte, une rétrorégulation, probablement exercée par les OPG eux-mêmes, se met en place

¹ Par comparaison, l'osmolarité d'un milieu complexe (type LB) ou d'un milieu minimum (type 63) se situe aux alentours de 300 mosM (milliosmolaire).

pour maintenir constant la quantité d'OPG dans le périplasme. Il suffit alors d'ajuster la concentration au cours de la croissance. Cette rétrorégulation peut s'effectuer par le contrôle de l'activité enzymatique de biosynthèse ou par celui de la synthèse d'au moins une protéine du système. Dans les deux cas, OpgH ou l'opéron *opgGH* semblent les meilleurs candidats puisque le contrôle s'exerce sur une étape précoce de la synthèse : l'élongation du squelette glucosidique. Si la régulation s'effectue uniquement au niveau génétique, la rétrorégulation et régulation en fonction de la phase de croissance n'en font peut-être qu'une puisque les OPG n'étant jamais dégradés, la concentration d'OPG restant optimale en phase stationnaire, toute synthèse est inutile.

Pour déterminer la nature de la régulation par l'osmolarité de la synthèse des OPG, l'évolution du taux de synthèse a été mesurée après des changements d'osmolarité en présence ou absence d'un inhibiteur de la traduction (chloramphénicol) ou de la transcription (rifampicine). Que ces changements soient brutaux (passage d'une osmolarité à une autre en quelques secondes) ou plus lents (passage d'une osmolarité à une autre en deux minutes par paliers successifs), les résultats sont les mêmes. Lors d'un transfert des cellules de 670 mosM à 70 mosM, le taux de synthèse augmente lentement pour arriver à son maximum au bout d'une génération et demie. Néanmoins, la quantité d'OPG optimale est atteinte en deux tiers de génération, ce qui reste encore lent. Cette lente augmentation n'est pas en faveur d'une adaptation de l'activité enzymatique à l'osmolarité du milieu comme le privilégiait alors E. P. Kennedy ni d'un rôle des OPG dans l'adaptation osmotique. L'ajout de chloramphénicol (200µg/ml) ou de rifampicine (50µg/ml) au moment du transfert à basse osmolarité empêche l'augmentation du taux de synthèse qui reste au niveau de celui mesuré à haute osmolarité. Lorsqu'on retire le chloramphénicol, la croissance reprend et le taux de synthèse mesuré augmente de manière identique à celui mesuré lors du transfert de 670 mosM à 70 mosM. Ces résultats indiquent clairement que la régulation osmotique s'effectue exclusivement au niveau génétique. Lors d'un transfert de 70 mosM à 670 mosM, le taux de synthèse chute brutalement de deux tiers pour se stabiliser au niveau de celui observé à 670 mosM. Ainsi, contrairement à ce qui est observé lors d'un passage de haute à basse osmolarité, le taux de synthèse s'ajuste très rapidement au taux de synthèse correspondant à la nouvelle osmolarité. Il est facile d'imaginer qu'au moins une enzyme du système est sensible à la force ionique mais dans cette hypothèse, une régulation par le contrôle de l'activité enzymatique par la force ionique suffirait, serait même la seule solution et il serait difficile de concilier les résultats de régulation génétique obtenus lors de la transition de haute vers basse osmolarité. L'alternative est le taux de renouvellement rapide d'une protéine du système qui, associé à la

régulation génétique pourrait expliquer cette chute brutale du taux de synthèse. Pour trancher entre ces deux hypothèses, du chloramphénicol ou de la rifampicine sont ajoutés à des bactéries uniquement cultivées à basse osmolarité. Le taux de synthèse mesuré après ajout des inhibiteurs chute brutalement de deux tiers et se stabilise à cette valeur de manière voisine à celle observée lors de la hausse d'osmolarité. Lorsque le chloramphénicol est retiré, la croissance reprend et le taux de synthèse augmente lentement de manière identique à celui mesuré lors d'un transfert de haute à basse osmolarité. Ces résultats valident l'hypothèse du renouvellement rapide d'une protéine au moins du système et renforce la nature génétique de la régulation. Il reste un tiers de l'activité qui reste stable au cours du temps après ajout du chloramphénicol. Cette fraction pourrait correspondre à la partie du système déjà synthétisée au moment de l'ajout du chloramphénicol mais cette hypothèse est en désaccord avec un taux de renouvellement protéique rapide sauf si les (ou la) protéines impliquées ne servent qu'une ou un nombre très limité de fois. Ainsi, ces protéines seraient stables tant qu'elles n'ont pas catalysé la réaction à laquelle elles participent mais seraient dégradées rapidement après leurs premières catalyses.

B/ Etude génétique

Durant le clonage du locus *opgGH* d'*E. coli*, j'ai cloné divers fragments du locus dans les trois plasmides pNM480, 481, 482 permettant de réaliser des fusions traductionnelles avec *lacZ*. Ce travail fait l'objet d'une partie de l'article Lacroix et coll., 1991. Ne connaissant pas alors la localisation du promoteur, j'ai cloné dans le site *SmaI* des pNM les fragments *SmaI* et *EcoRV* ou *EcoRV* et *SspI* sachant que l'insert portant *opgGH* est borné par deux sites *SspI*. Un fragment *SspI* *EcoRV* de 2 kb, obtenu dans pNM480 porte une fusion active qui contient la totalité du gène *opgG*. Le point de fusion se situe au tout début de *OpgH* ce qui permet, bien que cette protéine soit membranaire, d'avoir une fusion *opgH-lacZ* active. Ce plasmide, pNF252, a été introduit dans des souches *recA*, *Δlac* portant divers allèles du locus *opgGH*. L'expression de la β-galactosidase est voisine dans les souches portant l'allèle sauvage, l'allèle *opgH200::Tn10* et l'allèle *opgG202::neo*. L'activité β-galactosidase décroît d'un facteur de cinq à sept lorsqu'on passe d'une osmolarité de 70 mosM à 670 mosM. Le même type de résultats a été obtenu (facteur cinq) lors de l'analyse de l'abondance du transcrit de *opgGH*. Ce facteur est le même que celui observé pour la quantité d'OPG mesurée aux mêmes osmolarités. Par contre, dans un contexte *opgA1*, l'activité β-galactosidase double lors du passage de 70 à 670 mosM. Bien que ce facteur deux ne soit sûrement pas significatif, il

reste que la mutation *opgA1* abolit la régulation osmotique de l'opéron *opgGH* mais que les OPG eux-mêmes ne participent pas à cette régulation. Ces résultats confirment une partie de ceux obtenus lors de l'étude physiologique et montrent que la biosynthèse des OPG est régulée par l'osmolarité du milieu au niveau de l'opéron *opgGH* et que la protéine OpgH participe à cette régulation.

C/ Conclusion

Il apparaît clair que chez *E. coli*, la régulation a lieu au niveau génétique sur l'opéron *opgGH* à l'exception peut-être de la rétrorégulation qui pourrait s'exercer directement sur OpgH. De plus, OpgH participerait à la régulation de son propre opéron. Il reste cependant de nombreuses inconnues. Comment agit OpgH dans la régulation, il faudrait pour cela caractériser la nature moléculaire de la mutation *opgA1*. La nature même de la régulation semble complexe. Il ne semble pas y avoir de facteur limitant puisque nous avons une régulation en présence d'un plasmide à nombre de copies multiples. Dans notre recherche de mutants affectés dans la régulation, F. Page et moi-même avons isolé une mutation dans le gène *malK* (codant l'ATPase du transporteur de type ABC des maltodextrines) conduisant à une surexpression d'une fusion chromosomique *opgH-lacZ* mais ne modifiant pas la quantité d'OPG dans le périplasme. Aucune explication satisfaisante n'a pu être avancée pour expliquer ce résultat. De plus, l'opéron *opgGH* ferait partie du régulon σ^E (51A). Pourtant, dans un mutant *sulA*, conduisant à une forte activité de σ^E , je n'ai pas observé de différences dans la quantité d'OPG synthétisés chez *E. coli*. A ce jour, seule la régulation osmotique des OPG conduit à une variation de la quantité de ceux-ci dans la cellule. J'ai montré que cette régulation faisait varier lentement la quantité d'OPG dans la périplasme (par rapport au temps de génération des bactéries). Ces données vont à l'encontre d'un rôle direct des OPG dans la protection contre le stress osmotique. Même si notre étude sur la régulation de la biosynthèse des OPG est la plus aboutie de toutes celles réalisées à ce jour elle n'en reste pas moins très partielle mais l'absence d'un crible facile à utiliser nous a fait renoncer à poursuivre les études sur cette régulation.

IV/ ROLE DES OPG

A/ Phénotype des mutants *opg* chez *E. chrysanthemi*

Ce travail fait partie de l'article Page et coll., 2001 et a été réalisé par F. Page que j'ai coencadré.

Le choix d'*E. chrysanthemi* s'est imposé pour les raisons décrites plus haut. Il est communément admis que la virulence et le large spectre d'hôtes de cette bactérie sont fortement associés à la sécrétion d'exoenzymes dégradant les divers constituants de la cellule comme des protéases, cellulases et surtout de nombreuses pectinases. Les activités combinées de différentes pectine-lyases, pectate-lyases, polygalacturonases, pectine-acétyl-estérases et pectine-méthyl-estérases intervenant dans la dégradation de la pectine rendent compte non seulement de la complexité de sa structure au sein d'une espèce végétale mais aussi de la variabilité de cette structure, chaque plante possédant une structure de pectine pariétale différente (12). Néanmoins, les endopectates lyases semblent jouer le plus grand rôle dans la macération des tissus. L'action de ces enzymes permet l'extension de la maladie et fournit la bactérie en sources de carbone. L'expression de ces gènes est régulée de manière complexe par plusieurs régulateurs répondant à divers stimulus (109). En particulier, l'expression des 5 pectates lyases majeures (PelA à PelE) est induite par la phase stationnaire, par un système capteur de quorum (ExpI/ExpR, 202), par certains métabolites de la plante, par les produits de dégradation de la pectine et par la carence en fer. Cette expression est sous le contrôle de la répression catabolique et réprimée par la carence en azote et par la haute osmolarité. Alors que les protéases sont sécrétées dans le milieu extérieur par un système de sécrétion de type I, cellulases et pectinases traversent l'enveloppe grâce à un système de sécrétion de type II comprenant une quinzaine de protéines dont l'expression est régulée de manière voisine de celle des pectinases. Cependant, même si ces enzymes sont responsables des symptômes de la maladie, la pourriture molle, elles ne sont que partiellement responsables de la pathogénie de cette bactérie et la nécrose des tissus ne représente que la partie visible du processus de pathogénie. En effet, de nombreux autres facteurs sont nécessaires à l'aboutissement complet de la maladie comme des systèmes de capture du fer (162), des systèmes de défenses contre divers types de molécules antimicrobiennes (149) synthétisées par l'hôte, la motilité mais aussi des systèmes beaucoup moins étudiés mais nécessaires aux premières étapes de l'infection comme par exemple la reconnaissance ou l'adhésion aux cellules hôtes (205). La majorité de ces systèmes sont constitués par des molécules localisés dans l'enveloppe

(adhésion, systèmes de sécrétion, motilité, capture du fer, dégradation de peptides antimicrobiens, résistance aux drogues...). Le développement complet de la maladie passe par une succession d'étapes dont certaines correspondent à une adaptation d'*E. chrysanthemi* à son nouvel environnement : l'hôte. Cette adaptation passe également par une perception des variations de l'environnement par la bactérie. Ces variations de l'environnement sont souvent perçues par des systèmes à deux composants (102). Un capteur, doué d'activité kinase et phosphatase, généralement membranaire, perçoit un ou plusieurs signaux dont il transmet les variations en modulant la phosphorylation d'un régulateur. La variation du taux de phosphorylation de ce régulateur modifie l'expression des gènes cibles apportant une réponse adaptée aux changements environnementaux rencontrés par la bactérie.

Les mutants *opg* d'*E. chrysanthemi* ont un phénotype pléiotrope. Comme chez *E. coli* (83), la motilité fortement réduite, mesurée sur boîte de gélose molle, est probablement due, à un défaut de synthèse ou d'assemblage du flagelle. La synthèse des exopolysaccharides est augmentée comme en témoigne le caractère muqueux des souches et l'augmentation d'un facteur 3 de l'expression d'une fusion *epsG-lacZ*. La résistance aux sels biliaires est très réduite : 50% de survie à 1,5g/l contre 11g/l pour la souche sauvage. Selon les milieux de culture et/ou en fonction de la phase de croissance, les cellules filamentent ou sont de taille inférieures à la normale indiquant un problème général de division cellulaire chez le mutant. La synthèse et la sécrétion des exoenzymes sont diminuées. En effet, le halo de dégradation du polygalacturonate, estimation sur boîte de l'activité des pectinases sécrétées, est absent. L'expression des fusions *pelC-lacZ*, *pelE-lacZ* et *outC-lacZ* comme l'activité globale des pectinases mesurée *in vitro* est diminuée de 50%. De plus, seulement 30% de cette activité est retrouvée dans le milieu extérieur contre plus de 80% chez la souche sauvage. Les activités cellulases et protéases sécrétées, estimées sur boîte par le diamètre du halo de dégradation de la carboxyméthylcellulose ou des protéines du lait, sont faibles (cellulases) ou nulles (protéases). Enfin, comme chez *P. syringae*, la virulence est totalement abolie. Nombre de ces phénotypes suggèrent une altération de la structure de l'enveloppe de la bactérie. La motilité et la sécrétion des exoenzymes étant des éléments de la virulence de cette bactérie, on pourrait émettre l'hypothèse que l'absence totale de virulence des mutants *opg* n'est qu'indirecte et ne représente que la somme de défauts accumulés par les mutants *opg* en raison d'une enveloppe défectueuse. Des expériences de coinoculation ont alors été réalisées sur tubercules de pomme de terre entre la souche sauvage et la souche *opgG*, la souche sauvage et la souche *outS* (dépourvue du système de sécrétion Out), la souche sauvage et la souche *msrA* (dépourvue de motilité, 79) dans des proportions de mutant de 99%, 90% et 10%. Les bactéries des deux

souches sont dénombrées dans la pourriture molle obtenue après 3 jours de macération. Alors que leur croissance est affectée en inoculation simple, le pourcentage des mutants *outS* ou *msrA* lors de cette coinoculation ne varie pas après macération indiquant qu'ils ont une croissance normale dans la plante. Leur(s) défaut(s) peuvent être « complétés » par les fonctions apportées par la souche sauvage. Par contre, lors de la coinoculation avec la souche *opgG*, aucune croissance du mutant n'est observée, la souche sauvage ayant augmentée durant la même période d'un facteur de 4500. Le pourcentage du mutant après macération chute drastiquement mais le nombre de cellules reste identique de celui de l'inoculum indiquant que les mutants *opgG* restent viables. Ainsi, la perte de virulence des mutants ne résulte pas simplement du cumul des déficiences de motilité et de sécrétion d'exoenzymes et apparaît comme beaucoup plus complexe puisqu'il semble impliquer un problème de reconnaissance de l'environnement. Des mutants *tol* provoquent un phénotype voisin (à l'exception d'une virulence seulement atténuée) même si nous ne sommes pas en mesure de dire si les causes de ce phénotype sont identiques (73). Le système Tol est constitué par un ensemble de protéines assemblées en un complexe qui traverse l'enveloppe et participe à la structuration et à la stabilité de cette enveloppe (143).

B/ Recherche de supresseurs chez *E. chrysanthemi*

Ce travail fait l'objet d'une grande partie de la thèse de F. Bouchart que je coencadre.

Les OPG font donc partie des constituants de l'enveloppe impliqués dans la pathogénie. Il reste à démontrer leur fonction dans le processus infectieux. Nous avons utilisé deux approches complémentaires : Une approche protéomique qui sera développée dans le prochain chapitre et une approche génétique par recherche de supresseur du phénotype Opg^- qui sera développée dans ce chapitre.

Cette recherche de supresseurs a débuté par une mutagenèse à la nitrosoguanidine de la souche *opgG*. Ce type d'agent mutagène conduit à l'obtention de mutations ponctuelles plus difficiles et plus longues à caractériser que des mutants par insertion de transposons. On peut donc s'étonner que chez une espèce comme *E. chrysanthemi* où nous disposions régulièrement de l'avancée du séquençage du génome, la mutagenèse par transposon n'a pas été privilégiée puisqu'il suffit de séquencer la jonction pied du transposon/gène interrompu pour connaître la nature de ce gène. La mutagenèse par transposon conduit presque invariablement à l'obtention de mutation nulle alors que la mutation par agent chimique

permet d'isoler une large gamme de mutants incluant les mutants nuls mais aussi des mutants de perte ou gain partiels de fonction donnant potentiellement plus d'information.

Après mutagenèse, nous avons recherché des bactéries ayant retrouvé une motilité. 10^6 bactéries dans 5 μ l ont été déposées en goutte sur des boîtes de nage. Le diamètre du halo de nage est alors intermédiaire entre celui observé pour la souche sauvage et la souche mutante *Opg⁻*. Des bactéries sont prélevées à la périphérie du halo de nage, purifiées et de nombreux clones sont testés à nouveau pour la nage. 40 clones ayant retrouvé leur motilité ont ensuite été testés pour d'autres caractères du phénotype pléiotrope des mutants *Opg⁻* (sécrétion des exoenzymes et virulence sur tubercule de pomme de terre) en s'attachant à l'isolement de clones ayant restauré tous les caractères testés. 8 clones de ce type ont ainsi été isolés. L'un d'eux a été caractérisé plus précisément. La mutation suppressive a été nommée *sup2* en attendant sa cartographie. Les bactéries du mutant supresseur a une motilité identique à celle des bactéries sauvages. Cette souche n'est plus muqueuse indiquant une synthèse d'exopolysaccharide proche de celle de la souche sauvage. La résistance aux sels biliaires est partiellement restaurée. En effet, le taux de survie de 50% des bactéries *sup2/opgG* est de 4g/l (1,5g/l pour les mutants *opgG*, 11g/l pour la souche sauvage). Les cellules ne filamentent plus. On observe également une restauration de la sécrétion des exoenzymes (pectinases, cellulases et protéases), estimée sur boîte à un niveau légèrement inférieur à celle observée chez la souche sauvage. Plus précisément, l'activité pectinase sécrétée mesurée *in vitro* monte à 50% de celle observée chez le sauvage. La virulence des bactéries du mutant *sup2/opgG* est également restaurée partiellement. En effet, alors que la virulence sur tubercule de pomme de terre est complètement restaurée, celle sur feuille d'endive n'est pas rétablie. Ainsi, nous sommes en présence du mutant *sup2/opgG* dont la restauration de la virulence dépend du tissu de la plante dans lequel il se trouve. Cette différence pourrait être due à des mécanismes de défense plus élaborés dans les feuilles que dans des organes de réserves comme les tubercules. En effet, les bactéries d'un mutant *sodA*, codant une superoxyde dismutase, ne présentent aucune virulence sur feuilles de *Saintpaulia ionantha* mais sont normalement virulentes sur tubercule de pomme de terre (215). Le phénotype de la souche *sup2* a été analysé après avoir rendu *opgG⁺* la souche *sup2/opgG*. Par rapport à la souche sauvage, le mutant *sup2* produit presque deux fois moins d'OPG, sécrète une fois et demi plus de pectinases et il est hyperrésistant aux sels biliaires. On observe également une macération des tissus de la plante plus rapide dans le tubercule de pomme de terre comme dans la feuille d'endive. Cette hypervirulence pourrait traduire une dérégulation du contrôle de certains paramètres du processus infectieux. De plus, la mutation *sup2* est également un supresseur de mutations *tol*.

Nous avons entrepris la cartographie de la mutation *sup2* en recherchant un transposon inséré dans un gène lié à la mutation *sup2*. Plusieurs tentatives infructueuses ont été tentées pour isoler un tel transposon dans la souche *sup2/opgG*. Malheureusement, alors que nous obtenons des pools d'insertion de transposon et que nous transduisons cette souche par des lysats du phage ϕ EC2, il est très difficile d'en obtenir un lysat transducteur efficace. Nous avons donc engendré plusieurs pools d'insertion par une mutagenèse par le transposon Tn5 dans la souche sauvage EC3937. Nous avons ensuite réalisé un lysat transducteur généralisé par le phage ϕ EC2 de ces pools. Ces lysats ont été appliqués à la souche *sup2/opgG* et nous avons criblé des clones muqueux parmi une population de clones non muqueux. Nous avons donc recherché des clones redevenus *sup+*. Cette méthode offre également l'avantage d'éviter de cribler des mutants interrompus dans la voie de biosynthèse des exopolysaccharides. Une insertion de Tn5 cotransductible à 24% avec la restauration du phénotype muqueux a été isolée. La séquence de la jonction pied du transposon/gène interrompu a été réalisée et a permis de montrer que c'est le gène inconnu n° 20432. Si on applique la formule de Wu (261), le gène muté est à 20kb du transposon. A cette distance, un locus susceptible de contenir un gène dont une mutation pourrait conduire au phénotype décrit est présent des deux côtés du transposon. D'un côté, le locus *acrAB* code un transporteur impliqué dans la détoxification (efflux) de molécules délétères mais il ne pourrait alors expliquer, à priori, que la résistance aux sels biliaires contrairement au locus *rscCBD* repéré de l'autre côté du transposon. En effet, le locus *RcsCBD* peut expliquer plusieurs des phénotypes observés. Il code un système capteur/régulateur à trois partenaires impliqué à la fois dans la régulation de la biosynthèse des gènes de motilité, des exopolysaccharides. L'étude de la régulation de la biosynthèse des exopolysaccharides est à l'origine non seulement de la découverte de ce système (92, 231) mais aussi de la mise en relation entre les OPG et RcsCBD chez *E. coli*. En effet, en 1997, Ebel et coll. (78), en recherchant des clones muqueux ont isolé un clone portant une mutation d'insertion de transposon dans *opgH*. Cette souche redevenait non muqueuse lorsqu'ils y introduisaient une mutation de *rscC*, *rscB* ou *rscA*, *rscD* n'étant alors pas encore découvert. Ces auteurs postulaient que la variation d'abondance des OPG serait le signal perçu par RcsC pour moduler l'expression des gènes de synthèse des exopolysaccharides.

Nous avons donc séquencé ce locus et montré qu'il existe une mutation, appelée *rscC2*, dans le gène *rscC* qui conduit, au niveau de la protéine, au changement de la valine 463 en alanine. Le système Rcs est composé de trois protéines (157). RcsC (935 acides aminés) est un capteur transmembranaire (Figure 2) possédant 2 segments transmembranaires

séparés par une région périplasmique sensée percevoir les stimulus en provenance du milieu. La longue partie C-terminale cytoplasmique suivant le second segment transmembranaire possède trois régions d'intérêt. La première est un domaine PAS qui pourrait aussi percevoir des stimulus mais d'origine cytoplasmique (petites molécules, protéines, niveau d'oxydoréduction, 186). La deuxième possède un domaine histidine kinase ainsi que le résidu histidine phosphorylable. La mutation portée par RcsC2 se situe une dizaine d'acides aminés en amont de ce domaine. La troisième possède un domaine receveur (aussi appelé régulateur) contenant un résidu aspartate phosphorylable. RcsD (889 acides aminés) est une protéine transmembranaire possédant une structure voisine de celle de RcsC. Les différences résident dans l'absence du domaine PAS, du domaine histidine kinase et le domaine receveur est remplacé par un domaine histidine transmetteur de phosphate possédant une histidine phosphorylable. Par contre, le segment périplasmique est présent et pourrait donc participer à la perception du stimulus. Enfin, RcsB (216 acides aminés) est un régulateur cytoplasmique possédant un domaine receveur contenant un résidu aspartate phosphorylable et un domaine de liaison aux séquences d'ADN régulatrices des gènes cibles. Le modèle postule que la cascade de phosphorylation s'effectue de la manière suivante, la déphosphorylation empruntant le chemin inverse. Après perception du signal, l'histidine de RcsC est phosphorylée par RcsC et/ou RcsD, le phosphate est ensuite transmis à son aspartate puis à l'histidine de RcsD et enfin à l'aspartate de RcsB (231, 236). Chez *E. coli*, ce dernier interagit soit seul, soit en hétérodimère avec RcsA selon les promoteurs cibles (253). Le système Rcs réprime l'expression de *flhDC* (86) dont les produits gouvernent eux-mêmes l'expression des gènes de motilité, active l'expression des gènes de synthèse des exopolysaccharides (*cps*) par l'intermédiaire de RcsA/RcsB. Il contrôle aussi, par l'intermédiaire de RcsB, certains aspects de la division cellulaire (activation de *ftsZ*, *ftsA*, 41) et participe à certaines étapes de l'élaboration des biofilms (87). RcsCBD régulerait négativement, de manière indirecte, l'expression de gènes du système Tol (49). Indirectement, RcsB influence l'expression des gènes dépendant du facteur sigma RpoS (σ^S) puisqu'il contrôle l'expression du petit ARN RprA qui régule positivement la traduction de σ^S (156). Chez des bactéries pathogènes, le système RcsCBD est également impliqué dans la virulence. Chez *E. chrysanthemi*, *rscA* est absent, RcsB agit donc seule ou associée à une ou des protéines encore inconnues. Il module alors l'activité des gènes correspondants.

Ainsi, dans un mutant *Opg⁻*, l'ensemble des phénotypes suggère une augmentation du taux de RcsB phosphorylé par RcsCD. L'absence d'OPG induirait l'augmentation du rapport de l'activité kinase/phosphatase de RcsCD. La protéine RcsC2, dans un contexte *opgG*,

baisserait le niveau de phosphorylation de RcsB pour le rendre compatible avec un développement satisfaisant de la bactérie dans un grand nombre de conditions. Dans le mutant *RcsC2/opgG*, une expression normale voire une surexpression des gènes *tol* est envisageable et pourrait renforcer la structure de l'enveloppe affaiblie par l'absence d'OPG. Le niveau de phosphorylation de RcsB pourrait se retrouver plus bas que le sauvage dans un contexte *rscC2* ce qui conduirait à une hypervirulence dans plusieurs types de tissus.

Pour tester cette hypothèse, nous avons dosé l'expression d'une fusion *cpsB-lacZ* dans les différents contextes. *cpsB* est un gène impliqué dans la synthèse des exopolysaccharides qui présente l'intérêt d'être activé directement par le système Rcs. Il permet donc de mesurer le degré d'activation du système et indirectement d'en déduire un niveau relatif de phosphorylation de RcsB. Par rapport à la souche sauvage, l'expression de *cpsB* est quatre fois supérieure chez le mutant *opgG*, une fois et demie plus importante chez le double mutant *opgG/rscC2*, semblant confirmer ainsi les hypothèses précédemment énoncées. Par contre, ce niveau est identique dans la souche sauvage et dans le mutant *rscC2* indiquant que les hypothèses citées plus haut ne sont qu'une partie de l'explication ou bien que nous avons accès au niveau de base de l'expression de *cpsB* et qu'il nous est donc impossible de savoir si le système Rcs est moins exprimé.

C/ Analyse protéomique comparative chez *E. chrysanthemi*

Ce travail fait l'objet d'une partie des thèses de F. Bouchart et d'A. Delangle que je coencadre. Ce travail fait partie de l'article Bouchart et coll., soumis pour publication à Proteomics.

Nous nous sommes intéressés aux modifications d'expression des protéines solubles d'une souche *opgG*. Les cellules ont été cultivées en milieu LB sans NaCl (basse osmolarité). Les protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Les polypeptides contenus dans les spots présentant une différence d'intensité entre les souches sauvages et mutantes ont été extraits. Leur empreinte peptidique a été déterminée par spectrométrie de masse puis comparée à la base de données génomique d'*E. chrysanthemi* dont nous disposons (J.-P. Bohin étant l'un des annotateurs du génome de cette bactérie) pour identifier leur gène et donc leur fonction putative. La fonction de 51 des 56 polypeptides analysés a pu être identifiée, 43 d'entre elles sont cytoplasmiques.

On peut classer les protéines dont l'expression varie en plusieurs catégories. La première correspond à des protéines impliquées permettant d'expliquer certains des phénotypes observés chez les mutants *Opg⁻*.

Cinq protéines participant à la biosynthèse des exopolysaccharides sont surexprimées. Il s'agit de l'UDP-glucose déshydratase (Ugd), qui participe également chez *Salmonella enterica* et *Yersinia pestis* à une modification du LPS permettant une résistance accrue aux peptides antimicrobiens (182, 258), de la phosphomannomutase (CpsG), protéine spécifique de cette biosynthèse, des 2 sous unités de l'UTP-glucose-1-phosphate uridilyltransférase (GalU/GalF) et de l'UDP-glucose-4-épimérase (GalE), ces trois dernières étant impliquées dans la synthèse de plusieurs polysaccharides mais aussi dans d'autres métabolismes comme celui du galactose (129).

L'absence d'OPG perturbe la structure des membranes (résistance aux sels biliaires diminuée). L'analyse de gels monodimensionnels de protéines membranaires révèle une augmentation de OmpA, protéine structurale de membrane externe retrouvée fréquemment surexprimée chez de nombreuses bactéries lors d'agression causée à l'enveloppe. RffG, mais également GalU/GalF et GalE, nécessaires à la synthèse de l'ECA et du LPS, sont surexprimés indiquant une modification de la structure de polysaccharides liés à la membrane et/ou une augmentation de la partie glycanique de ces molécules. Ces conclusions sont étayées par une étude comparative des glycoconjugués bactériens qui révéla une augmentation significative des monosaccharides constituant le LPS chez un mutant *opgG* par rapport à la souche sauvage (23). L'acétyl CoA carboxylase (AccC) participant à la première étape de la biosynthèse des acides gras est surexprimée. Cette enzyme serait l'étape limitante du système (62). Le renouvellement des acides gras s'accompagne d'une augmentation de leur saturation puisque l'énoyl-ACP reductase (FabI), impliquée dans la désaturation des acides gras, est sous exprimée, indiquant une baisse de la fluidité membranaire (129). Une analyse comparative de la composition des phospholipides avait déjà montré une augmentation du degré de saturation des acides gras chez le mutant (23). Ainsi, une profonde modification de la structure et/ou de l'abondance des composants de l'enveloppe, que se soit au niveau protéique, polysaccharidique ou lipidique, est nécessaire chez les mutants *Opg⁻* pour permettre à l'enveloppe de continuer à assurer au moins en partie sa cohésion et son rôle protecteur.

Le déroulement de la division cellulaire est également perturbé chez le mutant. Chez ce dernier, deux protéines liées à la division cellulaire sont surexprimées. La première, PepA, qui en plus de son rôle de peptidase, est une protéine impliquée dans la recombinaison spécifique de site Xer nécessaire lors de la ségrégation de certains chromosomes fils liés

covalamment durant la réplication (163). Nous ne savons pas si l'augmentation d'expression de cette protéine résulte de problèmes supplémentaires à ce niveau ou bien si c'est seulement de l'augmentation de l'activité peptidase dont le mutant a besoin. La deuxième, ClpX, est la sous unité ATPasique de la protéase ClpXP. ClpX seule interagit et module l'assemblage de FtsZ, une tubuline indispensable pour la formation du septum de division cellulaire. Chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*, les cellules filamentent lorsqu'on surexprime ClpX, FtsZ étant piégée dans le cytoplasme (252). L'expression de FtsZ est sous la dépendance du système Rcs. La surexpression de RcsB conduit à celle de FtsZ, la division des bactéries est plus précoce et les cellules filles sont plus petites (41). Dans un mutant Opg⁻, les concentrations de FtsZ et ClpX sont supérieures à la normale. Elles pourraient néanmoins varier en fonction de la phase de croissance et/ou du milieu de culture permettant des rapports FtsZ/ClpX tantôt favorables à la filamentation, tantôt favorables à la formation de cellules plus petites que la normale.

La deuxième catégorie correspond à des protéines dont la variation d'expression permet d'ajouter un phénotype aux mutants Opg⁻. En effet, la synthèse d'énergie est augmentée, des protéases, des peptidases et des chaperons sont surexprimés suggérant que l'absence d'OPG induit la réponse générale au stress, phénotype encore jamais décrit.

Les systèmes de transport de nutriments semblent surexprimés. Dans notre étude, seuls les systèmes de transport de type ABC, comportant donc une protéine soluble, pourront être détectés, limitant ainsi la portée de notre affirmation. MglB est une protéine affine périplasmique indispensable pour le transport du galactose (129) alors qu'OppA est celle indispensable pour la nutrition par les peptides et pour recycler les muropeptides (180).

Le flux des sucres vers la glycolyse est augmenté, la néoglucogenèse est réprimée. Le catabolisme des sucres est donc augmenté chez le mutant. Une seule enzyme est sous exprimée. Il s'agit de la malate déshydrogénase qui catalyse la transformation du malate en pyruvate et qui réduit donc l'une des deux voies néoglucogéniques (129). Trois enzymes de la glycolyse sont surexprimées. Pgi, la phosphoglucose isomérase catalyse la première étape de la dégradation du glucose. La fructose biphosphate aldolase majeure (FbaA) est utilisée à 95% dans le sens de la glycolyse et n'est pas indispensable pour la néoglucogenèse (207). La phosphoglycérate mutase (GpmA) catalyse une des dernières étapes conduisant au pyruvate. De plus, sept enzymes alimentant à différents niveaux la glycolyse sont surexprimées ainsi que deux systèmes de transport de nutriments. Trois sont impliquées dans le catabolisme du glycérol en dihydroxyacétone phosphate (GlpD, GlpK et GlpQ), deux autres participent au catabolisme du galactose (GalU/GalF et GalE). Pour ces trois protéines, autant leur surexpression est indispensable à la surproduction d'exopolysaccharides, LPS et ECA, autant

nous ne pouvons pas conclure si cette surexpression est également nécessaire pour alimenter la glycolyse. Enfin, les deux dernières, la 6-phosphogluconate déshydrogénase (Gnd) et la transcétolase majeure (TktA) sont impliquées dans la voie des pentoses. Chez *E. coli*, la transcétolase est l'enzyme clé qui régule le flux entre la voie des pentoses et la glycolyse. Elle est essentielle pour le catabolisme des pentoses (207) et sa surproduction augmente la synthèse de glyceraldéhyde-3-phosphate et de fructose -6-phosphate, deux intermédiaires de la glycolyse. Deux enzymes du cycle de Krebs sont surexprimées. Il s'agit de la citrate synthase (GltA) et de la succinate déshydrogénase (SdhA). La surexpression de cette dernière suggère que le cycle est fermé et qu'il fonctionne donc à la fois pour fournir des précurseurs et produire de l'énergie. En effet, chez *E. coli*, en aérobiose, le cycle de Krebs n'est pas fermé puisqu'il s'arrête au niveau du succinate et n'est donc utilisé que pour fournir des précurseurs indispensables pour l'anabolisme (58). Ces résultats traduisent une augmentation des besoins en énergie du mutant. La transcétolase est surexprimée lors du stress provoqué par les sels biliaires chez *Bifidobacterium longum* (212) et jouerait un rôle dans la protection contre le stress oxydatif chez *Saccharomyces cerevisiae* (223). La phosphoglycérate mutase est surproduite chez plusieurs espèces bactériennes soumises à divers stress (212). Enfin, Chez *E. coli*, une augmentation de la respiration est associée à la surexpression de la succinate déshydrogénase lors de la synthèse de protéines recombinantes induites par la température (104). Ce besoin accru en énergie se retrouve fréquemment lorsque les bactéries sont en état de stress indiquant que l'augmentation du catabolisme fait partie intégrante de la réponse au stress.

D'autres protéines plus connues pour leur surexpression lors de la réponse aux stress sont surexprimées chez le mutant. Elles sont au nombre de sept. Parmi celles-ci on trouve trois chaperons. L'un périplasmique, FkpA, n'a été détecté que chez le mutant. Les deux autres, Tig et GroEL/GroES sont cytoplasmiques. Dans le cas de GroEL/GroES, seule la sous unité GroES est significativement surexprimée. Toutes trois participent à la mise en conformation des protéines néosynthétisées. Tig est liée au ribosome et fonctionne en association avec DnaK pour la mise en conformation mais aussi l'adressage des protéines (68). Une protéase périplasmique, DegQ, est surexprimée chez le mutant tout comme deux peptidases cytoplasmiques PepA (déjà citée plus haut) et PepB. Pour ClpXP, protéase cytoplasmique, seule la surexpression de ClpX a été détectée ce qui ne nous permet pas d'affirmer que cette protéase est surexprimée. Cependant, les deux gènes sont sous le contrôle du même promoteur et *clpP* est le premier gène de cet opéron suggérant une surproduction de la protéase. On peut ajouter à cet inventaire MglB et OppA (déjà citée pour leur rôle dans le

transport) deux protéines périplasmiques qui possèderaient une activité de type chaperon et participeraient donc à la protection contre le stress dans le périplasme (203). Ces deux protéines sont surexprimées chez *E. coli* cultivée en anaérobiose à haut pH (266). Dans ce cas encore, nous ne savons pas si la surexpression de ces deux protéines sert le transport, la stabilisation de la structure des protéines ou les deux. Certaines de ces protéines participent également à la virulence de bactéries pathogènes. Le gène *fkpA* fait partie du régulon sigma E. Sigma E est un facteur sigma alternatif activé lors d'une hausse du nombre de protéines mal conformées dans le périplasme et Sigma E est nécessaire pour la virulence (61). FkpA participe à la survie intracellulaire de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Cette même survie intracellulaire dépend de la présence de la protéine Mip, une protéine de type FkpA, chez *Legionella pneumophila* et *Chlamydia trachomatis* (6, 107). PepA est également impliquée dans la régulation de facteurs de virulence chez *Vibrio cholerae* (16).

La dernière catégorie correspond à la modification d'expression qu'il est difficile d'expliquer même si elles ont été observées chez d'autres bactéries dans des conditions de stress ou de virulence. On peut noter la surexpression de RpoA, sous unité α de l'ARN polymérase, connue pour interagir avec certains régulateurs. Elle est surexprimée durant l'infection chez *Chlamydia pneumoniae* et durant l'exposition aux sels biliaires chez *B. longum* (212, 179). La synthèse des purines est augmentée puisque PurA et PurB. GlyA sont également surexprimées. Cette dernière est une enzyme clé de la biosynthèse des purines mais également de la thymidine et des biosynthèses des acides aminés que sont la glycine, la méthionine et la sérine (129). La surexpression de membres de ces familles de protéines a été observée durant l'exposition aux sels biliaires chez *B. longum* (212). De plus, l'expression de gènes de biosynthèse des acides aminés et des bases nucléotidiques est modifié chez *S. enterica* durant la phase de développement intracellulaire de l'infection des macrophages (80). Des mutations *hisG*, ou *trpC* ou *pyrB* (synthèse de l'histidine, du tryptophane et des pyrimidines respectivement) chez cette même bactérie provoquent un phénotype de filamentation à l'intérieur de la cellule hôte. De plus, l'effet de la mutation *hisG* est indirect puisque la filamentation est due à la surexpression de HisF et HisH, deux autres protéines de la voie de biosynthèse de l'histidine (98).

Il subsiste quelques incertitudes concernant le rôle physiologique de la surexpression de quelques protéines participant à plusieurs fonctions cellulaires différentes (GalU, OppA, ClpX...). Ces incertitudes, associées à l'impossibilité de pouvoir détecter toutes les protéines au niveau d'expression variable, constituent les limites de la méthode. Néanmoins, ces résultats indiquent une forte perturbation de tous les compartiments du métabolisme des

cellules mutantes. Ils confirment l'implication des OPG dans la virulence puisque nombre de gènes dont l'expression est modifiée ont été retrouvés associés à la pathogenèse d'autres bactéries. Certaines modifications d'expression confirment certains des phénotypes observés par ailleurs validant ainsi les nouveaux phénotypes décrits qui n'auraient sans doute pas été révélés sans cette étude.

D/ CONCLUSION

Il est communément admis que l'absence ou l'altération d'un composé de l'enveloppe (OPG, protéines Tol, LPS...) modifie les propriétés de cette enveloppe et que cette perturbation entraîne par exemple des défauts de reconnaissance, d'adhésion, de motilité. De plus, et de manière encore plus systématique lorsqu'il s'agit d'une structure glucidique, on imagine généralement une molécule ayant un contact direct avec le milieu extérieur avec une fonction limitée à la reconnaissance et à l'adhésion. Par ces analyses de génétique et de protéomique, nous avons montré que l'absence d'un oligosaccharide périplasmique soluble de l'enveloppe, qui n'est pas localisé à la surface de la cellule, et jugé encore récemment facultatif, modifie l'ensemble du métabolisme et des structures cellulaires. Les OPG jouent même probablement un rôle de messager indispensable pour la transmission d'information en provenance du milieu extérieur. La perte de virulence, les défauts d'adaptation, sont le fruit d'un ensemble de changements dus à des modifications métaboliques profondes. Ainsi, même s'il n'est pas localisé à sa surface, un composé de l'enveloppe module les interactions de la cellule avec son environnement. Chez les mutants Opg^- , le dérèglement du système Rcs joue un rôle important dans l'altération du métabolisme même s'il nous est encore impossible de dire s'il est le seul système de perception et/ou de régulation impliqué dans ces changements.

La précision temporelle de l'activation du système Rcs est cruciale pour le bon déroulement du processus infectieux. Plus généralement, ce système semble important lors de changements des conditions environnementales. En effet, le système Rcs sera induit lors d'une hausse de l'osmolarité ou d'un dessèchement, lors de la transition milieu liquide/milieu solide et sera nécessaire lors de l'élaboration d'un biofilm... En fait, de nombreux types de variations que nous appelons stress sont en majorité des adaptations à de nouvelles conditions de vie auxquelles la bactérie est évolutivement adaptée. L'absence d'OPG conduit à un dysfonctionnement du système Rcs qui conduit la cellule à une modification de l'expression des gènes cibles. Le niveau d'activité élevé du système Rcs dans une souche Opg^- correspond peut-être à certaines conditions environnementales mais pas à celles rencontrées lors de la

totalité du processus infectieux. L'absence d'OPG semble empêcher la modulation de l'activité du système Rcs, figeant la cellule dans une configuration telle qu'elle perçoit son environnement comme étant toujours le même. Alternativement, L'absence d'OPG n'empêche pas la modulation du système Rcs mais cette modulation s'effectue à contre temps de sorte qu'elle perçoit le milieu toujours différemment de ce qu'il est réellement. La mutation *rscC2* seule conduit également à un dysfonctionnement du système Rcs conduisant à des phénotypes différents de ceux provoqués par l'absence d'OPG mais qui pourrait également s'expliquer par le même type d'hypothèses. Même si on peut raisonnablement étendre à d'autres espèces les résultats trouvés chez *E. chrysanthemi*, les gènes *rsc* ne sont pas présents chez toutes les bactéries. Il est probable que les OPG interagissent alors avec d'autres systèmes à deux composants de fonction voisine.

L'implication des OPG dans la virulence des bactéries a été démontrée chez d'autres espèces bactériennes. Ainsi, les OPG sont nécessaires à la virulence de plusieurs bactéries phytopathogènes (ou symbiotiques) comme *Xanthomonas campestris* pathovar *Vesicatoria* (176). Ces données viennent s'ajouter à celles présentées ici sur *E. chrysanthemi* et *P. syringae* pathovar *Syringae* et à celles déjà obtenues chez les Rhizobiacées (voir plus haut). D'une manière qui semble moins évidente, les OPG participent également à la virulence de bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal. Il a été récemment démontré que les OPG sont nécessaires à la survie intracellulaire des bactéries du genre *Brucella*. De plus, contrairement à ce qui avait été montré chez *A. tumefaciens*, une autre Rhizobiacées (234), la coinoculation de mutants *opg* de *Brucella abortus* avec des OPG purifiés de sa propre espèce lui permettent de retrouver une virulence partielle en évitant la fusion du phagosome avec le lysosome (6). Il est vraisemblable que le cas de ce genre bactérien est une exception et que les OPG exercent leur fonction lorsqu'ils se trouvent dans le périplasme. Chez *Salmonella enterica* pathovar. *Tiphymurium*, une souche portant une mutation dans un gène homologue à *opgB* (*opgB*), présente une virulence réduite chez la souris (244). Malheureusement, des mutants *opgGH* ou *opgB* obtenus dans notre laboratoire en collaboration avec celui de F. Norel ne présentent pas ce défaut de virulence (résultats non publiés). Ces résultats sont à rapprocher de ceux déjà décrits plus haut à propos de *S. flexneri*. Chez *Yersinia enterocolitica*, *opgH* fait partie des gènes chromosomiques de virulence (268). Chez *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *opgH* fait partie des gènes dont l'interruption abolit la virulence à la fois chez *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* et *Caenorhabditis elegans*. Il est aujourd'hui admis que de nombreux facteurs de virulence sont communs à toutes les bactéries pathogènes (155), qu'elles le soient pour les animaux ou les plantes et les OPG font partie de ces facteurs de

virulence communs. Néanmoins, l'étude du rôle des OPG est compliqué par des phénotypes de virulence d'intensité variable chez les pathogènes pour l'animal (il faudrait faire en plus la distinction entre invertébrés et vertébrés) où la bactérie a du s'adapter à des défenses de l'hôte de plus en plus sophistiquées. Les OPG font alors partie d'un plus grand nombre de facteurs de virulence et rendent le phénotype des mutants *opg* moins facile à observer que chez les plantes.

V/ PERSPECTIVES

A/ Les relations OPG/RcsCBD

Le système Rcs participe à la régulation de nombreux gènes impliqués dans diverses fonctions. La modulation de l'activité du système Rcs passe par l'intermédiaire de trois molécules clairement identifiées mais pourrait en compter un plus grand nombre (158) : les OPG, la protéine IgaA et la lipoprotéine RcsF. Chez *S. enterica*, la protéine transmembranaire IgaA module négativement l'activité du système Rcs. Le défaut d'activité de cette protéine provoque une virulence atténuée, un phénotype muqueux et une motilité réduite. Cette protéine aurait comme seul rôle de modérer l'activité du système Rcs puisque les doubles mutant *rscC/igaA* ou *rscD/igaA* présentent une virulence normale (70). Par contre, RcsF active le système Rcs (158). Nous essayons de déterminer où se placent les OPG dans ce réseau. Les OPG pourraient interagir directement avec RcsC (et/ou RcsD), chacun des trois modulateurs agissant alors de manière indépendante. Dans ce cas, les OPG moduleraient négativement l'activité du système Rcs. Les OPG pourraient également interagir avec RcsF (en plus ou à la place de son interaction avec RcsC et/ou RcsD) pour moduler l'interaction entre RcsF et RcsC (et/ou RcsD). De la même manière, les OPG pourraient moduler l'activité de IgaA mais de manière opposée à l'action réalisée sur RcsF. De plus, ces mêmes modulations pourraient nécessiter l'interaction d'une ou de plusieurs protéines du système Tol avec les OPG. Il sera donc nécessaire de déterminer quelles sont les interactions entre ces différents protagonistes par des méthodes biochimiques associée à l'analyse des phénotypes de divers couples de mutants. La majorité des mutants ponctuels déjà isolés sur RcsC, que se soit chez *S. enterica* ou *E. coli*, sont des mutants dont le phénotype indique une augmentation du rapport RcsB-phosphate/RcsB (Figure 2). Nous possédons un crible permettant d'isoler des mutants au rapport inverse. Une mutagenèse aléatoire sur les gènes *rscC* et *D* d'*E. chrysanthemi* devrait permettre d'isoler de nouveaux mutants de ce type et d'accroître nos connaissances sur ce système phosphorelais. Pour analyser le niveau relatif d'activité des

mutants, il est nécessaire de créer deux fusions transcriptionnelles sur deux opérons cibles de RcsCBD régulés de manière opposée.

B/ Protéomique.

Les données obtenues sur le mutant *opgG* lors de l'étude protéomique nous incite à poursuivre sur cette voie. En effet, nous ne savons pas si les phénotypes observés chez le révertant *opgG/rcsC2* sont corrélés à l'expression d'un protéome voisin de celui de la souche sauvage. Il serait intéressant de savoir si l'hypervirulence du mutant *rcsC2* nécessite un protéome très différent de celui de la souche sauvage et en quoi est-il différent. Enfin, il serait souhaitable de définir les différences d'expression des protéines membranaires entre le mutant *opgG* et la souche sauvage même si l'on sait déjà, de manière directe ou indirecte, que plusieurs constituants de l'enveloppe ont une expression modifiée. Les essais déjà effectués montrent certaines différences. Il reste à résoudre de nombreux problèmes de mise au point concernant la quantité et la solubilisation des protéines.

C/ Recherche de nouveaux mutants

Les gènes *rcsCBD* ne se retrouvent que chez les entérobactéries alors que les OPG sont présents chez la majorité des bactéries à Gram négatif et qu'ils semblent y jouer un rôle similaire. On peut donc penser que les OPG interagissent avec d'autres couples capteurs/régulateurs. Nous allons donc rechercher, chez *E. chrysanthemi*, d'autres systèmes affectés par la variation de la quantité d'OPG après avoir créé une banque d'insertions de fusions transcriptionnelles. L'analyse des gènes dont l'expression serait modifiée par l'absence d'OPG devrait nous permettre d'atteindre les autres systèmes à deux composants dont l'activité serait modulée par les OPG. Il faut poursuivre l'étude des supresseurs en utilisant d'autres cribles en vue d'isoler des supresseurs d'une seule fonction ou d'un nombre limité de fonctions.

D/ Biosynthèse des OPG

L'étude du mécanisme de biosynthèse des OPG doit se poursuivre chez *E. coli*. Notre hypothèse est que les diverses protéines catalysant la synthèse du squelette mais également celles impliquées dans la substitution agissent en un complexe multienzymatique (Figure 3). Les mutants d'*OpgG* étudiés semblent aller dans cette voie. En effet, alors que plusieurs mutants d'*OpgG* indiquent qu'elle serait l'enzyme de branchement des molécules de glucose

en β -1,6, l'un des mutants d'OpgG obtenu diminue fortement la substitution par les phosphoglycérols (catalysée par OpgB) sans altérer la structure du squelette (Thèse d'Eglantine Rollet au laboratoire). De plus, l'un de ces mutants produit des OPG au squelette allongé à la manière des mutants *opgD*. La mise au point de la reconstitution du système de synthèse est en cours chez *Bacillus subtilis*, bactérie à Gram positif. Nous pourrions rajouter un par un ou surexprimer les gènes du système lorsqu'ils codent des protéines membranaires. Dans un système *in vitro* utilisant des protoplastes, nous pourrions rajouter les protéines solubles purifiées par ailleurs pour tester l'activité de complexes partiels ou à la stœchiométrie perturbée. Les interactions pourraient également être mises en évidence par des méthodes biochimiques comme dans le cas des interactions OPG/RcsCD. Toutefois, dans un cas comme dans l'autre, plusieurs protéines mises en jeu sont membranaires. Il sera peut-être nécessaire d'exprimer les parties solubles de ces protéines membranaires pour observer les interactions en espérant que ces domaines solubles conservent hors de leur contexte leur structure tridimensionnelle d'origine.

OpgG est la seule protéine soluble périplasmique indispensable à la synthèse des OPG, c'est une protéine facilement accessible qui semble être une cible de choix pour des inhibiteurs de la synthèse des OPG. Plusieurs résultats suggèrent qu'elle interagirait à la fois avec OpgB et OpgH, son inhibition pourrait provoquer la déstructuration du complexe multienzymatique. Nous pourrions tester des molécules obtenues par chimie combinatoire à l'aide d'un crible choisi parmi les phénotypes révélés lors de l'étude des mutants *opg*.

VI/ BIBLIOGRAPHIE

1. **Aiba, H., T. Baba, K. Fujita, K. Hayashi, T. Inada, K. Isono, T. Itoh, H. Kasai, K. Kashimoto, S. Kimura, M. Kitakawa, M. Kitagawa, K. Makino, T. Miki, K. Mizobuchi, H. Mori, T. Mori, K. Motomura, S. Nakade, Y. Nakamura, H. Nashimoto, Y. Nishio, T. Oshima, N. Saito, G. Sampei, Y. Seki, S. Sivasundaram, H. Tagami, J. Takeda, K. Takemoto, Y. Takeuchi, C. Wada, Y. Yamamoto, and T. Horiuchi.** 1996. A 570-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0-40.1 min region on the linkage map. *DNA Res.* **3**:363-377.
2. **Altabe, S. G., N. Iñon de Iannino, D. de Mendoza, and R. A. Ugalde.** 1994. New osmoregulated β -(1-3), β (1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **176**:4890-4898.
3. **Altabe, S. G., P. Talaga, J.-M., Wieruszkeski, G. Lippens, R. Ugalde, and J.-P. Bohin.** 1998. Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*, p. 390. In C. Elmerich, A. Kondorosi, W. E. Newton (ed), Biological nitrogen fixation for the 21st century, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
4. **Altabe, S., N. Iñon de Iannino, D. de Mendoza, and R. A. Ugalde.** 1990. Expression of the *Agrobacterium tumefaciens chvB* virulence region in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* **172**:2563-2567.
5. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
6. **Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciochini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon, and J.-P. Gorvel.** 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* **6**:618-25.
7. **Astua-Monge, G., J. Freitas-Astua, G. Bacocina, J. Roncoletta, S. A. Carvalho, and A. Machado.** 2005. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J. Bacteriol.* **187**:1201-1205.
8. **Aufrère, R., Tempête, M., and Bohin J.-P.** 1986. Regulation of expression of the gene for vitamin B12 receptor cloned on a multicopy plasmid in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **205**:358-365.
9. **Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
10. **Banta, L. M., J. Bohne, S. D. Lovejoy, and K. Dostal.** 1998. Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J. Bacteriol.* **180**:6597-6606.
11. **Bardonnet, N., and C. Blanco.** 1992. 'uidA-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:243-248.
12. **Barras, F., F. Van Gijsegem, and A. K. Chatterjee.** 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:201-234.
13. **Bayan, N.** 1990. Rôle de "l'Acyl Carrier Protein" (A.C.P.) dans la biosynthèse des oligosaccharides osmorégulés (M.D.O.) chez *E. coli*. Thèse d'Université. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.
14. **Beaulieu, C., M. Boccara, and F. Van Gijsegem.** 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**:197-202.
15. **Becker, A., A. Kleickmann, W. Arnold, and A. Puhler.** 1993. Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted

- endo- β -1,3- β -1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* **238**:145-154.
16. **Behari, J., L. Stagon, and S.B. Calderwood.** 2001. *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **183**:178-188.
 17. **Berck, S., X. Perret, D. Quesada-Vincens, J.-C. Promé, W. J. Broughton, and S. Jabbouri.** 1999. NolL of *Rhizobium* sp. strain NGR234 is required for *O*-acetyltransferase activity. *J. Bacteriol.* **181**:957-964.
 18. **Bereswill, S., and K. Geider.** 1997. Characterization of the *rcsB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *J. Bacteriol.* **179**:1354-1361.
 19. **Bhagwat, A. A., K. C. Gross, R. E. Tully, and D. L. Keister.** 1996. Beta-glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1 \rightarrow 6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**:4635-4642.
 20. **Bhagwat, A. A., R. E. Tully, and D. L. Kaiser.** 1992. Isolation and characterization of an *ndvB* locus from *Rhizobium fredii*. *Mol Microbiol* **6**:2159-2165.
 21. **Bhagwat, A. A., R. E. Tully, and D. L. Keister.** 1993. Identification and cloning of a cyclic β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-D-glucan synthesis locus from *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**:139-144.
 22. **Blattner, F. R., G. Plunket III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
 23. **Bohin A, F. Bouchart, C. Richet, O. Kol, Y. Leroy, P. Timmerman, G. Huet, J.-P. Bohin and J.-P. Zanetta.** 2005. GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives. *Anal. Biochem.* **340**:231-244.
 24. **Bohin, J.-P.** 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria - a minireview. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:11-19.
 25. **Bohin, J.-P., and E. P. Kennedy.** 1984. Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**:956-957.
 26. **Bohin, J.-P., and E. P. Kennedy.** 1984. Regulation of the synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. Assay of phosphoglycerol transferase I *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **259**:8388-8393.
 27. **Bohringer, J., D. Fischer, G. Mosler, and R. Hengge-Aronis.** 1995. UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma S and sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:413-422.
 28. **Boos, W., U. Ehmman, E. Bremer, A. Middendorf, and P. Postma.** 1987. Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J. Biol. Chem.* **262**:13212-13218.
 29. **Bourson, C., S. Favey, S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1993. Regulation of the expression of a *pelA::uidA* fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of the synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis. *J. Gen. Microbiol.* **172**:6950-6958.
 30. **Breedveld, M. W., and K. J. Miller.** 1994. Cyclic β -glucans of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58**:145-161.
 31. **Breedveld, M. W., J. A. Hadley, and K. J. Miller.** 1995. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**:6346-6351.

32. **Breedveld, M. W., L. P. T. M. Zevenhuizen, and A. J. B. Zehnder.** 1992. Synthesis of β -(1,2)-glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* **174**:6336-6342.
33. **Brickman, E., and J. Beckwith.** 1975. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing phage. *J Mol. Biol.* **96**:307-316.
34. **Briones, G., N. Iñon de Iannino, M. Steinberg, and R. A. Ugalde.** 1997. Periplasmic cyclic 1,2- β -glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology* **143**:1115-1124.
35. **Broome-Smith, J. K., M. Tadayyon, and Y. Zhang.** (1990). β -lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol Microbiol* **4**:1637-1644.
36. **Brown, D. C., and K. D. Collins.** 1986. Dihydroorotase from *Escherichia coli*. Cloning the *pyrC* gene and production of tryptic peptide maps. *J Biol Chem* **261**:5917-5919
37. **Brown, D. G., and C. Allen.** 2004. *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Mol. Microbiol.* **53**:1641-1660.
38. **Cangelosi, G. A., G. Martinetti, and E. W. Nester.** 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 2172–2174.
39. **Cangelosi, G. A., G. Martinetti, J. A. Leigh, C. C. Lee, C. Theines, and E. W. Nester.** 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export β -1,2-glucan. *J Bacteriol.* **171**:1609-1615.
40. **Cangelosi, G. A., G. Martinetti., and E. W. Nester.** 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2-glucan. *J Bacteriol.* **172**:2172-2174.
41. **Carballès, F., C. Bertrand, J.-P. Bouché, and K. Cam.** 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division *ftsA* and *ftsZ* by two components system *rscC-rscB*. *Mol. Microbiol.* **34**:442-450.
42. **Case, C. C., B. Bukau, S. Granett, M. R. Villarejo, and W. Boos.** 1986. Contrasting mechanisms of *envZ* control of *mal* and *pho* regulon genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**:706-12.
43. **Cayley, D. S., H. J. Guttman, and M. T. Record Jr.** 2000. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**:1748-1764.
44. **Chen, R. A. A. Bhagwat, R. Yaklich, and D. L. Keister.** 2002. Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic β -(1-3),(1-6)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **48**:1008-1016.
45. **Choma, A., and I. Komaniecka.** 2003. Characterization of *Mesorhizobium huakuii* cyclic beta-glucan. *Acta Biochim. Pol.* **50**:1273-1281.
46. **Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein., C. H. Mody, and N. C. Engelberg.** 1990. A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* **162**:121-126.
47. **Ciocchini, A. E., M. S. Roset, N. Iñon de Iannino, and R. A. Ugalde.** 2004. Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* **186**:7205-713.
48. **Clarke, L., and J. Carbon.** 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91-99.

49. **Clavel, T, J.-C. Lazzaroni, A. Vianney, and R. portalier.** 1996. Expression of the TolQRA genes of *Escherichia coli* K12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol. Microbiol.* **19**:19-25.
50. **Cogez, V, E. Gak, A. Puskas, S. Kaplan, and J.-P. Bohin.** 2002. The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *Eur. J. Biochem.* **269**:2473-2484.
51. **Cogez, V., P. Talaga, J. Lemoine, and J.-P. Bohin.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**:3127-3133.
52. **Cohen, A., and A. J. Clark.** 1986. Synthesis of linear plasmid multimers in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **167**: 327-335.
53. **Cohen, J. L., and K. J. Miller.** 1991. A novel membrane-bound glucosyltransferase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4271-4276.
54. **Condemine, G., A. Castillo, F. Passeri, and C. Enard.** 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**:45-52.
55. **Condemine, G., and J. Robert-Baudouy.** 1995. Synthesis and secretion of *Erwinia chrysanthemi* virulence factors are coregulated. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:632-636.
56. **Crawford, I. P.** 1989. Evolution of a biosynthetic pathway: The tryptophan paradigm. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**:567-600.
57. **Cristobal, C., J.-W. de Gier, H. Nielsen, and G. von Heijne.** 1999. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**:2982-2990.
58. **Cronan, J. R., D. Laporte; in F. C. Neidhardt, A. Bock, R. Curtiss III, J. B. Kaper, T. Nyström, K. E. Rudd, and C. L. Squires (Ed.),** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, www.ecosal.org. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2005.
59. **Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147.
60. **Dagert, M., and Ehrlich, S.D.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-28.
61. **Dartigalongue, C, D. Missiakas, and S. Raina.** 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J. Biol. Chem.* **276**:20866-20875.
62. **Davis, M. S., J. Solbiati, and J. E. Cronan.** 2000. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:28593-28598.
63. **de Souza, A. A., M. A. Takita, H. D. Coletta-Filho, C. Caldana, G. M. Yanai, N. H. Muto, R. C. de Oliveira, L. R. Nunes, and M. A. Machado.** 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**:341-353.
64. **Debarbieux, L, A. Bohin, and J.-P. Bohin.** 1997. Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, OpgH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6692-6698.
65. **Dedonder, R.A., and W. Z. Hassid.** 1964. The enzymatic synthesis of a (β 1,2-) linked glucan by an extract of *Rhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* **90**:239-248.
66. **Delcour, A. H., J. Adler, C. Kung, and B. Martinac.** 1992. Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *E. coli* porin channel. *FEBS Lett.* **304**:216-220.

67. **Dessen, P., Fondrat, C., Valencien, C. and Mugnier C.** 1990. BISANCE: a french service for access to biomolecular sequence databases. *CABIOS* **6**:355-356.
68. **Deuerling, E., A. Schulze-Specking, T. Tomoyasu, A. Mogk, and B. Bukau.** 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**:693-696.
69. **Dilks, K., R. W. Rose, E. Hartmann, M. Pohlschroder.** 2003. Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J. Bacteriol.* **185**:1478-1483.
70. **Dominguez-Bernal, G., M. G. Pucciarelli, F. Ramos-Morales, M. Garcia-Quintanilla, D. A. Cano, J. Casadesus, and F. Garcia Del Portillo.** 2004. Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* **53**:1437-1449.
71. **Douglas, C. J., R. J. Staneloni, R. A. Rubin and E. W. Nester.** 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**:850-860.
72. **Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* **28**:350-356.
73. **Dubuisson, J.-F., A. Vianney, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J.-C. Lazzaroni.** 2005. Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology* **151**:3337-3347.
74. **Dunlap, J., E. Minami, A. A. Bhagwat, D. L. Keister, and G. Stacey.** 1996. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic β -glucan synthesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**:546-555.
75. **Dylan, T., D. R. Helinski, and G. S. Ditta.** 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1 \rightarrow 2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**:1400-1408.
76. **Dylan, T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas, M. Yanofsky, E. Nester, D. R. Helinski, and G. Ditta.** 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4403-4407.
77. **Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D.R., and Ditta, G.S.** 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**:1409-1417.
78. **Ebel, W., G. J. Vaughn, H. K. Peters III, and J. E. Trempy.** Inactivation of *mdoH* leads to increased expression, of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6858-6861.
79. **El Hassouni, M., J.-P. Chambost, D. Expert, F. Van Gijsegem, and F. Barras.** 1999. The minimal set gene member *msrA* encoding peptide methionine sulfoxide reductase is a virulent determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:887-892.
80. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**:103-118.
81. **Espinosa-Urgel, M., C. Chamizo, and A. Tormo.** 1996. A consensus structure for σ^S -dependant promoters. *Mol. Microbiol.* **21**:657-659.
82. **Fiedler, W., and H. Roterling.** 1985. Characterization of an *Escherichia coli mdoB* mutant strain unable to transfer *sn*-1-phosphoglycerol to membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **260**:4799-4806.
83. **Fiedler, W., and H. Roterling.** 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:14684-14689.

84. **Forns, N., A. Juarez, and C. Madrid.** 2005. Osmoregulation of the HtrA (DegP) protease of *Escherichia coli*: an Hha-H-NS complex represses HtrA expression at low osmolarity. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**:75-80.
85. **Fournet, B., G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil.** 1981. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methylglycosides: application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* **116**:489-502.
86. **Francez-Charlot, A., B. Jaugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M.-P. Castanié-Cornet, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:823-832.
87. **Francez-Charlot, A., M. -P. Castanié-Cornet, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2005. Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (Biofilm-Dependent Modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J. Bacteriol.* **187**:3873-3877.
88. **Garcia-Calderon CB, M. Garcia-Quintanilla, J. Casadesus, F. Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology.* **151**:579-88.
89. **Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1-2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**:880-884.
90. **Gluckman, M. A., T. L. Reuber, and G. C. Walker.** 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**:7045-7055.
91. **Goldberg, D. E., M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1981. The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglycerol transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**:5513-5517.
92. **Gottesman, S., P. Trisler, and A. Torres-Cabassa.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol* **162**:1111-1119.
93. **Gralla, G. D., and J. Collado-Vides.** 1996. Organization and function of transcription regulatory elements. p. 1232-1245. *In* F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger.(ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
94. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
95. **Hanoulle, X., E. Rollet, B. Clantin, I. Landrieu, C. Ödberg-Ferragut, G. Lippens, J.-P. Bohin, and V. Villeret.** 2004. Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Mol. Biol.* **342**:195-205.
96. **Hanoulle, X., E. Rollet, B. Clantin, I. Landrieu, C. Ödberg-Ferragut, G. Lippens, J.-P. Bohin, and V. Villeret.** 2004. Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Mol. Biol.* **342**:195-205.
97. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective? *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:591-595.
98. **Henry, T., F. Garcia-del portillo, and J.-P. Gorvel.** 2005. Identification of *Salmonella* functions critical for bacterial cell division within eucaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **56**:252-267.

99. **Hiniker, A., and J. C. Bardwell.** 2004. In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**:12967-12973.
100. **Hisamatsu, M.** 1992. Cyclic (1,2)- β -D-glucans (cyclophosphorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**:137-146.
101. **Hisamatsu, M., A. Amemura, K. Koizumi, T. Utamura, and Y. Okada.** 1983. Structural studies on cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclophosphorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Carbohydr. Res.* **121**:31-40.
102. **Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:165-170.
103. **Hoffman, C. S., and A. Wright.** 1985. Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5107-5111.
104. **Hoffmann, F., J. Weber, and U. Rinas.** 2004. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol. Bioeng.* **80**:313-319.
105. **Höltje, J. V., W. Fiedler, H. Roterling, B. Walderich, and J. van Duin.** 1988. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:3539-3541.
106. **Horlacher, R., K. Uhland, W. Klein, M. Ehrmann, and W. Boos.** 1996. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:6250-6257.
107. **Horne, S. M., T. J. Kottom, L. K. Nolan and K. D. Young.** 1997. Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella typhimurium* Copenhagen. *Infect. Immun.* **65**:806-810.
108. **Huang, X., and W. Miller.** 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* **12**:337-357.
109. **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser, and S. Reverchon.** 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:213-257.
110. **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., H. Dominguez, and J. Robert-Baudouy.** 1992. Environmental conditions affect transcription of the pectinases genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **174**:7807-7818.
111. **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1989. Expanded linkage map of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol. Microbiol.* **3**:573-581.
112. **Ielpi, L., T. Dylan, G. S. Ditta, D. R. Helinski, and S. W. Stanfield.** 1990. The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of β -(1,2)-glucan. *J. Biol. Chem.* **265**:2843-2851.
113. **Iñon de Iannino, N., and R.A. Ugalde.** 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -(1-2) glucan. *J. Bacteriol.* **171**: 2842-2849.
114. **Iñon de Iannino, N., G. Briones, M. Tolmasky, and R. A. Ugalde.** 1998. Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic β (1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J. Bacteriol.* **180**:4392-4400.
115. **Ize, B., N. R. Stanley, G. Buchanan, and T. Palmer.** 2003. Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol. Microbiol.* **48**:1183-1193.

116. **Jackson, B. J., and E. P. Kennedy.** 1983. The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membrane-bound phosphoglycerol transferase. *J. Biol. Chem.* **258**:2394-2398.
117. **Jackson, B. J., J.-P. Bohin, and E. P. Kennedy.** 1984. Biosynthesis of membrane derived oligosaccharides: Characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* **160**:976-981.
118. **Jackson, B.J., and Kennedy, E.P.** (1983) The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membrane-bound phosphoglycerol transferase. *J. Biol. Chem.* **258**:2394-2398.
119. **Ji, J., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1989. Molecular cloning of the *outJ* gene involved in pectate lyase secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **3**:285-293.
120. **Jorgensen, R. A., S. J. Rothstein, and W. S. Reznikoff.** 1979. A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol. Gen. Genet.* **177**:65-72.
121. **Kanehisa, M.I.** 1984. Use of statistical criteria for screening potential homologies in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res.* **12**:203-213.
122. **Karow, M., O. Fayet, A. Cegielska, T. Ziegelhoffer, and C. Georgopoulos.** 1990. Isolation and characterization of the *Escherichia coli htrB* gene, whose product is essential for bacterial viability above 33°C in rich media. *J. Bacteriol.* **173**:741-750.
123. **Kennedy, E. P.** 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1092-1095.
124. **Kennedy, E. P.** 1987. Membrane-derived oligosaccharides. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed-in-chief). Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 672-679.
125. **Kennedy, E. P.** 1996. Membrane derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*. p. 1064-1074. In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
126. **Kennedy, E. P., and M. K. Rumley.** 1988. Osmotic regulation of biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:2457-2461.
127. **Kennedy, E.P.** 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1092-1095.
128. **Kennedy, E.P., Rumley, M.K., Schulman, H., and van Golde, L.M.G.** 1976. Identification of *sn*-glycero-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**:4208-4213.
129. **Keseler I.M., J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil, P. D. Karp.** 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **33**:334-337.
130. **Koch, A. L.** 1998. The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**:23-59.
131. **Kohara, Y., K. Akiyama, and K. Isono.** 1987. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* **50**:495-508.
132. **Kolbe, A., A. Tiessen, H. Schluempmann, M. Paul, S. Ulrich, and P. Geigenberger.** 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**:11118-11123.

133. **Komaniecka, I., and A. Choma.** 2003. Isolation and characterization of periplasmic cyclic beta-glucans of *Azorhizobium caulinodans*. FEMS Microbiol. Lett. **227**:263-269.
134. **Koronakis, V., and C. Hughes.** 1988. Identification of the promoters directing in vivo expression of hemolysin genes in *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **213**:99-104.
135. **Kotoujanski, A., M. Lemattre, and P. Boistard.** 1982. Utilization of a thermosensitive episome bearing transposon Tn10 to isolate Hfr donor strains of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemii*. J. Bacteriol. **150**:122-131.
136. **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. **157**:105-132.
137. **Lacour, S., and P. Landini.** 2004. σ^S -Dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of σ^S -dependent genes and identification of their promoter sequences. J. Bacteriol. **186**:7186-7195.
138. **Lacroix, J.-M.** 1989. Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. Thèse d'Université. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.
139. **Lacroix, J.-M., E. Lanfroy, V. Cogez, Y. Lequette, A. Bohin, and J.-P. Bohin.** 1999. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. J. Bacteriol. **181**:3626-3631.
140. **Lacroix, J.-M., I. Loubens, M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin.** 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consist of an operon under osmotic control. Mol. Microbiol. **5**:1745-1753.
141. **Lacroix, J.-M., M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin.** 1989. Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **3**:1173-1182.
142. **Lanfroy, E., and J.-P. Bohin.** 1993. Physical map location of the *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I. J. Bacteriol. **175**:5736-5737.
143. **Lazzaroni, J.-C., P. Germon, M. C. Ray, and A. Vianney.** 1999. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membranes stability. FEMS Microbiol. Lett. **177**:191-197.
144. **Lequette, Y.** 2002. Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli*: analyse fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH et caractérisation de deux nouvelles activités. Thèse d'Université. Université des Sciences et Technologie de Lille, France.
145. **Lequette, Y., C. Ödberg-Ferragut, J.-P. Bohin, and J.-M. Lacroix.** 2004. Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. J. Bacteriol. **186**:3695-702.
146. **Levina, N., S. Totemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, M. A. Jones, and I. R. Booth.** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. EMBO J. **18**:1730-1737.
147. **Link, A. J., K. Robison, and G. M. Church.** 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. Electrophoresis **18**:1259-1313.
148. **Lippens, G., J.-M. Wieruszkeski, D. Horvath, P. Talaga, and J.-P. Bohin.** 1998. Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. J. Am. Chem. Soc. **120**:170-177.

149. **Llama-Palacios, A., Lopez-Solanilla E., Rodriguez-Palenzuela P.** 2005. Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. *J. Bacteriol.* **187**:2157-2162.
150. **Lojkowska, E., C. Masclaux, M. Boccara, J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1995. Characterization of the *pell* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **16**:1183-1195.
151. **Loubens, I., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohin.** 1992. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. In « Proc 8th Int Conf Plant Pathog Bact », Versailles, France.
152. **Loubens, I., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix, and J.-P. Bohin.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329-340.
153. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-271.
154. **Mah, T. F., B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart, and G. A. O'Toole.** 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**:306-310.
155. **Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47-56.
156. **Majdalani N, D. Hernandez, S. Gottesman.** 2002. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol. Microbiol.* **46**:813-826.
157. **Majdalani, N., and S. Gottesman.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:379-405.
158. **Majdalani, N., M. Heck, V. Stout, and S. Gottesman.** 2005. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:6770-6778.
159. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
160. **Manoil, C., and J. Beckwith.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8129-8133.
161. **Masclaux, C. and D. Expert.** 1995. Signaling potential iron plant microbe interaction: the pathogenic switch of iron transport in *Erwinia chrysanthemi*. *Plant J.* **7**:121-128.
162. **Masclaux, C., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and D. Expert.** 1996. Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyase in pathogenesis of African violets. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:198-205.
163. **Mc Culloch, R., M. E., Burke, and D. J. Sherratt.** 1994. Peptidase activity of *Escherichia coli* aminopeptidase A is not required for its role in Xer site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **12**:241-251.
164. **Médigue, C., A. Hénaut, A. Danchin.** 1990. *Escherichia coli* molecular genetic map (1000 kbp): update I. *Mol. Microbiol.* **4**:1443-1454.
165. **Médigue, C., T. Rouxel, P. Vigier, A. Hénaut, and A. Danchin.** 1991. Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. *J. Mol. Biol.* **222**:851-856.

166. **Michaelis, S., H. Inouye, D. Oliver, and J. Beckwith.** 1983. Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **154**:366-374.
167. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
168. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor Laboratory Press.
169. **Miller, J.H.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
170. **Miller, K. J., and E. P. Kennedy.** 1987. Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**:682-686.
171. **Miller, K. J., E. P. Kennedy, E.P., and V. N. Reinhold.** 1986. Osmotic adaptation by Gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. Science **231**:48-51.
172. **Miller, K.J., R. S. Gore, and A. J. Benesi.** 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β 1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. J. Bacteriol. **170**:4569-4575.
173. **Miller, K.J., R. S. Gore, R. Johnson, A. J. Benesi, and V. N. Reinhold.** 1990. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp.. J. Bacteriol. **172**:136-14.
174. **Miller, K.J., V. N. Reinhold, A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy.** 1987. Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. Biochim. Biophys. Acta **901**:112-118.
175. **Mills, D., and P. Mukhopadhyay.** 1990. Organization of the *hrpM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis, p. 47-57. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas*: biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology. ASM Press, Washington, D.C.
176. **Minsavage, G. V., M. B. Mudgett, R. E. Stall, and J. B. Jones.** 2004. Importance of *opgH_{Xcv}* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. Mol. Plant Microbe Interact. **17**:152-161.
177. **Minton, N. P.** 1984. Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. Gene **31**:269-273.
178. **Mogensen, J. E., and D. E. Otzen.** 2005. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. Mol. Microbiol. **57**:326-346.
179. **Molestina, R. E., J. B. Klein, R. D. Miller, W. H. Pierce, J. A. Ramirez, J. T. Summersgill.** 2002. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of Hep-2 cells. Infect. Immun. **70**:2976-2981.
180. **Monnet, V.** 2003. Bacterial oligopeptide-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. **60**:2100-2114.
181. **Moran, F., S. Nasuno, and M. P. Starr.** 1968. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid transeliminase of *Erwinia carotovora*. Arch. Biochem. Biophys. **123**:293-306.
182. **Mousslim, C., and E. A. Groisman.** 2003. Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-components regulatory systems. Mol. Microbiol. **47**:335-344.
183. **Mukhopadhyay, P., J. Williams, and D. Mills.** 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J. Bacteriol. **170**:5479-5488.

184. **Mulligan, M.E., D. K. Hawley, R. Entriken, and W. R. Mc Clure.** 1984. *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. *Nucleic. Acids Res.* **12**:789-800.
185. **Nakao, T., I. Yamato, and Y. Anraku.** 1987. Nucleotide sequence of *putP*, the proline carrier gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **208**:70-75.
186. **Neiditch, M. B, M. J. Federle, S. T. Miller, B. L. Bassler, and F. M. Hughson.** 2005. regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol. Cell* **18**:507-518.
187. **Neu, H.C., and L. A. Heppel.** 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**:3685-3692.
188. **Novick, R.P.** 1962. Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* **83**:236-240.
189. **Oliver, D. B.** 1996. Periplasm, p. 88-103. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
190. **Page, F., S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy, and J.-P. Bohin.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**:3134-41.
191. **Palmer, T., and B. C. Berks.** 2003. Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* **149**:547-556.
192. **Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, and G. Ricard.** 1984. A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**:41-47.
193. **Pearson, W.R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.
194. **Pfeffer, P. E., G. Becard, D. B. Rolin, J. Uknalis, P. Cooke, and S. Tu.** 1994. In vivo nuclear magnetic resonance study of the osmoregulation of phosphocholine-substituted β -1,3;1,6 cyclic glucan and its associated carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2137-2146.
195. **Platt, T.** 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:339-372.
196. **Poolman, B., P. Blount, J. H. A. Folgering, R. H. E. Friesen, P. C. Moe, and T. van der Heide.** 2002. How do membrane proteins sense water stress? *Mol. Microbiol.* **44**:889-902.
197. **Preiss, J., and T. Romeo.** 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Physiol.* **30**:183-238.
198. **Puvanesarajah, V., F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, E. W. Nester.** 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**:102-106.
199. **Raina, S., R. Raina, T. V. Venkatesh, and H. K. Das.** 1995. Isolation and characterization of a locus from *Azospirillum brasilense* Sp7 that complements the tumorigenic defect of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutant. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **8**:322-326.
200. **Rajagopal, S., N. Eis, M. Bhattacharya, and K. W. Nickerson.** 2003. Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for sodium dodecyl sulfate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**:25-31.
201. **Resibois, A., M. Colet, M. Faelen, M. Schoonejans, and A. Toussaint.** 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology.* **137**:102-112.

202. **Reverchon, S., M. L. Bouillant, G. Salmond, and W. Nasser.** 1998. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **29**:1407-1418
203. **Richarme, G., and T. D. Caldas.** 1997. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**:15607-15612.
204. **Roeder, D. L., and A. Collmer.** 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isoenzyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **164**:51-56.
205. **Rojas, C. M., J.-H. Ham, W.-L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer.** 2002. HecA, a member of a class of adhesions produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:13142-13147.
206. **Rolin, D. B., P. E. Pfeffer, S. F. Osman, B. S. Szwegold, F. Kappler, and A. J. Benesi.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted α -(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochem. Biophys. Acta* **1116**:215-225.
207. **Romeo, T., and J. L. Snoep:** in **F. C. Neidhardt, A. Bock, R. Curtiss III, J. B. Kaper, T. Nyström, K. E. Rudd, and C. L. Squires (Ed.),** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, www.ecosal.org. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2005.
208. **Roset, M. S., A. E. Ciocchini, R. A. Ugalde, and N. Iñon de Iannino.** 2004. Molecular cloning and characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan transporter gene, and its role in virulence. *Infect. Immun.* **72**:2263-2271.
209. **Ruby, E. G., and J. B. McCabe.** 1988. Metabolism of periplasmic membrane-derived oligosaccharides by the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J. Bacteriol.* **170**:646-652.
210. **Salmond, G. P. C.** 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:181-200.
211. **Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
212. **Sanchez, B., M.-C. Champomier-Vergès, P. Anglade, F. Baraige, C. G. de los Reyes-Gavilan, A. Margolles, and M. Zagorec.** 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. Bacteriol.* **187**:5799-5808.
213. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
214. **Santini, C.-L., A. Bernadac, M. Zhang, A. Chanal, B. Ize, C. Blanco, and L.-F. Wu.** 2001. Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J. Biol. Chem.* **276**:8159-8164.
215. **Santos, R., T. Franza, M.-L. Laporte, C. Sauvage, D. Touati, and D. Expert.** 2001. Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**:758-767.
216. **Schneider, J. E., V. Reinhold, M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1979. Structural studies of the Membrane-derived Oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **254**:10135-10138.
217. **Schulman, H., and E. P. Kennedy.** 1977. Identification of UDP-glucose as an intermediate in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**:6299-6303.

218. **Schulman, H., and E. P. Kennedy.** 1979. Localization of membrane-derived oligosaccharides in the outer envelope of *Escherichia coli* and their occurrence in other Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **137**:686-688.
219. **Scott, D. B., C. A. Young, J. M. Collins-Emerson, E. A. Terzaghi, E. S. Rockman, P. E. Lewis, and C. E. Pankhurst.** 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**:187-197.
220. **Sen, K., J. Hellman, and H. Nikaido.** 1988. Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **263**:1182-1187.
221. **Shevchik, V. E., and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **24**:1285-1301.
222. **Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor Laboratory Press.
223. **Slekar, H. K., D. J. Kosman, V. Cizewski Culotta.** 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* **271**:28831-28836.
224. **Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* **8**:3-27.
225. **Spratt, B.G., P.J. Hedge, S. te Heesen, A. Edelman, and J. K. Broome-Smith.** 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**:337-342.
226. **Stahl, B., M. Steup, M. Karas, and F. Hillenkamp.** 1991. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **63**:1463-1466.
227. **Stahl, B., S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, and G. Sawatski.** 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **223**:218-226.
228. **Stanfield, S.W., L. Ielpi, D. O'Brochta, D. R. Helinski, and G. S. Ditta.** 1988. The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β (1,2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* **170**:3523-3530.
229. **Stanley, N. R., K. Findlay, B. C. Berks, and T. Palmer.** 2001. *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**:139-144.
230. **Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**:7850-7861.
231. **Stout, V., and S. Gottesman.** 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:659-669.
232. **Strom, A. R., and I. Kaasen.** 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**:205-210.
233. **Swart, S, G. Smit, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne** 1993. Restoration of attachment, virulence and nodulation of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants by rhicadhesin. *Mol. Microbiol.* **10**:597-605.
234. **Swart, S, G. Smit, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne** 1993. Restoration of attachment, virulence and nodulation of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants by rhicadhesin. *Mol. Microbiol.* **10**:597-605.
235. **Tabata, S., Higashitani, A., Takanami, M., Akiyama, K., Kohara, Y., Nishimura, Y., Nishimura, A., Yasuda, S., and Hirota, Y.** 1989. Construction of an ordered cosmid collection of the *Escherichia coli* K-12 W3110 chromosome. *J. Bacteriol.* **171**:1214-1218.

236. **Takeda, S. I., Y. Fujisawa, M. Matsubara, H. Aiba, and T. Mizuno.** 2001. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC→YojN→RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol. Microbiol* **40**:440-450.
237. **Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin.** 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:6538-6544.
238. **Talaga, P., B. Stahl, J.-M. Wieruszkeski, F. Hillenkamp, S. Tsuyumu, G. Lippens, and J.-P. Bohin.** 1996. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* **178**:2263-2271.
239. **Talaga, P., V. Coge, J.-M. Wieruszkeski, B. Stahl, J. Lemoine, G. Lippens, J.-P. Bohin.** 2002. Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* **269**:2464-72.
240. **Tardy, F., W. Nasser, J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potentials inhibitors. *J. Bacteriol.* **179**:2503-2511.
241. **Teather, R. M., and P. J. Wood.** 1982. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:777-780.
242. **Thérisod, H., A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy.** 1986. An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane oligosaccharides of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:7236-7240.
243. **Thérisod, H., and E. P. Kennedy.** 1987. The function of acyl carrier protein in the synthesis of membrane-derived oligosaccharides does not require its phosphopantetheine prosthetic group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:8235-8238
244. **Valentine, P. J., B. P. Devore, and F. Heffron.** 1998. Identification of three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect. Immun.* **66**:3378-3383.
245. **Van Gijsegem, F., A. Toussaint, and E. Schoonejans.** 1985. In vivo cloning of pectate lyase and cellulase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *EMBO J.* **4**:787-792.
246. **Van Golde, L. M. G., H. Schulman, and E. P. Kennedy.** 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:1368-1372.
247. **Vieira, J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
248. **Vojnov, A. A., H. Slater, M. A. Newman, M. J. Daniels, and J. M. Dow.** 2001. Regulation of the synthesis of cyclic glucan in *Xanthomonas campestris* by a diffusible signal molecule. *Arch. Microbiol.* **176**:415-420.
249. **von Heijne, G.** 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nuc Acids Res* **14**:4683-4690.
250. **Von Heijne, G.** 1992. Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**:487-494.
251. **Wang, P., C. Ingram-Smith, J. A. Hadley, and K. J. Miller.** 1999. Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **181**:4576-4583.
252. **Weart, R. B., S. Nakano, B. E. Lane, P. Zuber, and P. A. Levin.** 2005. The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* **57**:238-249.

253. **Wehland, M., and F. Bernhard.** 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem* **275**:7013-7020.
254. **Weissborn, A. C., and E. P. Kennedy.** 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of β ,1-2-linked polyglucose chains. *J. Biol. Chem.* **259**:12644-12651.
255. **Weissborn, A. C., M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1992. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in production of membrane-derived oligosaccharides. *J. Bacteriol.* **174**:4856-4859.
256. **Wieruszkeski, J.-M., A. Bohin, J.-P. Bohin, and G. Lippens.** 2001. In vivo detection of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* by high-resolution magic angle spinning NMR. *J. Magn. Reson.* **151**:1-6.
257. **Wilson, H.R., P. T. Chan, and C. L Turnbough Jr.** 1987. Nucleotide sequence and expression of the *pyrC* gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**:3051-3058.
258. **Winfield, M. D., T Latifi, and E. A. Groisman.** 2005. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* **280**:14765-14772.
259. **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
260. **Wood, J. M.** 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:230-262.
261. **Wu, T. T.** 1966. A model for a three point analysis of random general transduction. *Genetics* **54**:405-410.
262. **Yager, T.D., and P. H. von Hippel.** 1991. A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**:1097-1118.
263. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
264. **Yeats, C., and A. Bateman.** 2003. The BON domain: a putative membrane-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **28**:352-355.
265. **Yim, H. H., R. L. Brems, and M. Villarejo M.** 1994. Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene. *J. Bacteriol.* **176**:100-107.
266. **Yohannes, E., D. M. Barnhart, and J. L. Slonczewski.** 2004. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **186**:192-199.
267. **York, W. S.** 1995. A conformational model for cyclic β -(1 \rightarrow 2)-linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**:205-225.
268. **Young, G. M., and V. L. Miller.** 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **25**:319-328.
269. **Zorreguieta, A., and R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1-2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**:947-951.
270. **Zorreguieta, A., R. A. Ugalde, and L.F. Leloir.** 1985. An intermediate in cyclic β 1-2 glucan biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:352-357.

VII/ ARTICLES COMPLETS

RESUME

Les Glucanes Périplasmiques Osmorégulés (OPG) sont présents dans le périplasma de la majorité des bactéries à Gram négatif. Ils forment une famille d'oligosaccharides de taille intermédiaire linéaires ou cycliques selon l'espèce bactérienne. Ils sont d'autant plus abondants que l'osmolarité du milieu est basse. Leur squelette est uniquement constitué de molécules de glucose. Ce squelette est plus ou moins substitué selon l'espèce. La biosynthèse s'effectuerait au sein d'un complexe regroupant la totalité des enzymes catalysant la biosynthèse du squelette et le transfert des substituants. Leur absence provoque un phénotype pléiotrope incluant une perte de motilité, une sécrétion accrue d'exopolysaccharides, une forte perturbation du métabolisme intermédiaire et l'induction de la réponse au stress. De plus, les OPG sont des facteurs d'importance dans la pathogenèse puisque leur absence provoque une perte de virulence aussi bien chez les bactéries phytopathogènes que chez celles pathogènes pour l'animal. Les OPG sont un des éléments majeurs de la perception et la transmission des variations de l'environnement. Ils interagissent probablement avec différents couples capteur/régulateur qui modulent l'expression de gènes indispensables à l'adaptation aux changements environnementaux.