

gen 2017 5969

50376,
1995,
313

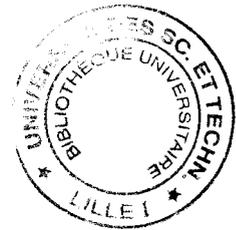
S
N° d'ordre : 1625

Université des Sciences et Technologies de Lille-Flandres Artois

Thèse

présentée pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR en SCIENCES
de L'UNIVERSITE de LILLE I



par

Laurent DEBARBIEUX

SUJETS : Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez
Escherichia coli : analyse topographique et étude de l'expression
de la glucosyltransférase membranaire MdoH.

Analyse topographique de la protéine SpoIIIGA
de *Bacillus subtilis*

Soutenu le 20 Décembre 1995 devant la commission d'examen

Président	M. André VERBERT
Rapporteurs	M. Claude J. LAZDUNSKI M. Jean van HEIJENOORT
Examineurs	M. Gérard VERGOTEN M. Jean-Pierre BOHIN

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père.

Je remercie ma mère et mes soeurs de m'avoir toujours soutenu dans les différents choix que j'ai effectué au cours de ces dernières années.

De même, merci à Isabelle pour son soutien sans faille.

Je tiens à remercier Messieurs Claude Lazdunski, Jean van Heijenoort, Gérard Vergoten et André Verbert d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Jean-Pierre Bohin d'avoir accepté un « non-microbiologiste » au sein de son équipe. Qu'il sache que je lui suis reconnaissant de m'avoir permis d'effectuer mes premiers pas en recherche.

Un grand merci à toute l'équipe du « 002 ».

Merci pour avoir supporté mon caractère de plus en plus râleur et maniaque !!!

Un merci tout particulier à Jean-Marie pour ses conseils et le temps passé à construire les souches *galU*, et à Anne pour son dévouement dans la réalisation des gels de protéines.

Un grand merci au « gentil » Frédéric pour sa bonne humeur et ses réflexions « pile-poil ».

Merci à Philippe pour ses conseils chromatographiques et merci à Eric pour ses conseils informatiques qui m'ont fait gagner beaucoup de temps.

Enfin, merci à Sabine pour son enthousiasme, et à Sylvia pour ses « chi, chi » et ses « NON »!!!

Un dernier merci à toutes les personnes du « C9 » qui m'ont aidé dans ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	7
1 - INTRODUCTION	8
I : PRESENTATION SOMMAIRE DE L'ENVELOPPE D'<i>Escherichia coli</i>	9
A) LES COMPOSES LIPIDIQUES DE L'ENVELOPPE	9
1°) Les phospholipides.....	9
2°) Le lipopolysaccharide.....	9
B) LES PRINCIPALES PROTEINES DE L'ENVELOPPE	11
1°) Les protéines de la membrane interne.....	11
2°) Les protéines de la membrane externe.....	12
C) LES STRUCTURES ANNEXES DE L'ENVELOPPE	15
1°) La capsule.....	15
2°) Flagelles et pilis.....	15
D) LE PERIPLASME	16
1°) Le peptidoglycane.....	16
2°) Les protéines.....	17
II : LES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES	19
A) LE MDO D'<i>Escherichia coli</i>	19
1°) Découverte et structure.....	19
2°) Gènes et protéines de la voie de biosynthèse.....	21
3°) La régulation osmotique.....	27
B) LES AUTRES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES CONNUS	29
1°) Les glucanes de <i>Pseudomonas syringae</i>	29
2°) Les glucanes d' <i>Erwinia chrysanthemi</i>	29
3°) Les glucanes de <i>Rhizobium meliloti</i> et d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
4°) Les autres GPO récemment analysés.....	30
C) LES FONCTIONS DES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES	31
1°) Fonction chez <i>P. syringae</i>	31
2°) Fonction chez <i>E. chrysanthemi</i>	31
3°) Fonction chez les Rhizobiacées.....	31
4°) Hypothèses sur la fonction du MDO.....	31
5°) But du travail de thèse.....	32

III : LES DIFFERENTS TYPES DE PROTEINES MEMBRANAIRES.....	35
A) LES PROTEINES AYANT PLUSIEURS SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES	35
1°) Les porines.....	35
2°) Les centres de réaction photosynthétique.....	35
3°) Les protéines ayant une fonction de transport	36
4°) Les protéines n'ayant pas une fonction de transport	39
B) LES PROTEINES AYANT UN SEUL SEGMENT TRANSMEMBRANAIRE	39
1°) La partie aminée est à l'intérieur du cytoplasme.....	39
2°) La partie aminée est à l'extérieur du cytoplasme	39
C) LES PROTEINES LIEES COVALEMMENT AUX LIPIDES.....	41
1°) Les lipoprotéines bactériennes	41
2°) Les protéines eucaryotes ancrées par des acides gras	41
D) LES PROTEINES AFFINES POUR LES MEMBRANES.....	41
2 - RESULTATS.....	45
I : ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>mdoH</i>	45
A) EXPRESSION DU GENE <i>mdoH</i> A PARTIR D'UN VECTEUR D'EXPRESSION.....	45
1°) Le gène <i>mdoH</i> peut permettre une amplification de la quantité de MDO.....	45
2°) Détermination de la taille du produit du gène <i>mdoH</i>	45
B) EXPRESSION DU GENE <i>mdoH</i> A L'INTERIEUR DE L'OPERON <i>mdoGH</i>	51
1°) Recherche d'un couplage traductionnel entre <i>mdoG</i> et <i>mdoH</i>	51
2°) Identification de la mutation <i>mdoG215</i>	51
3°) Mise en évidence d'un promoteur secondaire pour <i>mdoH</i>	57
4°) La protéine MdoG limite la quantité de MDO.....	59
II : ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE MdoH	61
A : LE SYSTEME GLUCOSYLTRANSFERASE <i>IN VITRO</i>	61
1°) L'activité glucosyltransférase est membranaire.....	61
2°) La structure des produits formés est différente de la structure du MDO	63
B) MISE AU POINT D'UN NOUVEAU SYSTEME PERMETTANT LA REVELATION DE L'ACTIVITE DE MdoH <i>IN VIVO</i>	65
1°) La technique mise au point chez <i>Rhizobium meliloti</i>	65
2°) La technique mise au point chez <i>E. coli</i>	65

III : ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE MdoH.....	71
A) DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES PROTEINES MEMBRANAIRES	71
1°) Les méthodes de prédiction des structures secondaires	71
2°) Les méthodes de fusions de gènes	77
3°) Les méthodes physiques	81
4°) Les méthodes de prédictions de structures tridimensionnelles.....	82
B) REALISATION DE LA TOPOGRAPHIE DE LA PROTEINE MdoH	83
1°) Localisation de la protéine MdoH dans la membrane cytoplasmique	83
2°) Construction de fusions aléatoires avec la β -lactamase.....	85
3°) Etablissement du modèle de la topographie de MdoH.....	93
4°) Le rôle des acides aminés chargés pour confirmer la topographie.....	93
5°) Le modèle topographique définitif.....	95
6°) La région centrale de MdoH possède une organisation de type α/β	97
7°) Mesure de l'activité de biosynthèse du MDO des protéines de fusion.....	97
C : PREMIERES EXPLOITATION DE LA TOPOGRAPHIE DE MdoH	105
1°) Insertion d'un oligonucléotide	105
2°) mutagenèse dirigée.....	106
3 - DISCUSSION	109
I - EXPRESSION DU GENE <i>mdoH</i>	109
1°) Le couplage traductionnel entre <i>mdoG</i> et <i>mdoH</i>	109
2°) La surexpression de MdoH.....	109
3°) Localisation du promoteur secondaire	110
4°) L'opéron <i>mdoGH</i> serait réprimé à haute osmolarité.....	110
II - FONCTIONS DES PROTEINES MdoG ET MdoH	111
A) HYPOTHESES SUR LE ROLE DE LA PROTEINE MdoG.....	111
1°) La fonction d'initiation.....	111
2°) La fonction de libération.....	112
3°) La fonction de ramification.....	112
4°) La substitution secondaire	112
5°) La protéine codée par l'allèle <i>mdoG215</i>	113
B) LA PROTEINE MdoH EST UNE GLUCOSYLTRANSFERASE.....	113
1°) L'activité glucosyltransférase <i>in vitro</i>	113

2°) L'activité glucosyltransférase <i>in vivo</i>	114
III - RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DE LA PROTEINE MdoH	117
A) LA PROTEINE MdoH EST UNE PROTEINE MEMBRANAIRE A 8 SEGMENTS	117
B) PREMIERES RELATIONS STRUCTURES-FONCTIONS DE MdoH	117
1°) Le site d'interaction avec L'UDP-glucose est cytoplasmique	117
2°) MdoH permettrait-elle la translocation du MDO ?.....	118
3°) La deuxième boucle périplasmique est impliquée dans l'activité de MdoH.....	119
4°) L'extrémité carboxylique est indispensable à l'activité de synthèse.....	120
5°) Rôle des six arginines consécutives.....	120
6°) MdoH est-elle une protéine membranaire régulatrice ?.....	121
IV - LES GLUCOSYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE	
DES GPO.....	122
1°) Les glucosyltransférases des Rhizobiacées	122
2°) La glucosyltransférase MdoH.....	123
4 - ANNEXE	125
ETUDE TOPOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE SpoIIIGA DE <i>Bacillus subtilis</i>	
I : INTRODUCTION GENERALE	125
II : REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DURANT LA SPORULATION	127
A) DE L'INITIATION A LA SEPTATION.....	127
1°) La décision de sporuler.....	127
2°) La régulation de l'initiation de la sporulation	128
3°) La mise en place de la septation.....	129
B) ETABLISSEMENT DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES	131
1°) Le contrôle de l'activité de σ^F	131
2°) Le contrôle de l'activité de σ^E	133
C) DU STADE II A LA SPORE LIBRE	133
1°) Du stade II au stade III.....	133
2°) La phase tardive du développement de la préspore.....	133
3°) La phase tardive dans la cellule mère	135

III : ANALYSE TOPOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE SpoIIIGA.....	137
A) LE GENE <i>spoIIIGA</i> ET SON PRODUIT	137
1°) Le gène <i>spoIIIGA</i>	137
2°) La protéine SpoIIIGA	137
B) L'ETUDE TOPOGRAPHIQUE.....	139
1°) Construction de fusions aléatoires avec la β -lactamase.....	139
2°) Réalisation d'une fusion ciblée avec la β -lactamase.....	139
3°) Dosages des activités β -lactamase des protéines de fusion	140
IV : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	142
5 - DISCUSSION GENERALE	145
I - AVANTAGES DE LA TECHNIQUE DE FUSION AVEC LA β -LACTAMASE.....	145
II - INCONVENIENTS DE LA TECHNIQUE DE FUSION AVEC LA β -LACTAMASE	145
III - FUTURE UTILISATION DE LA β -LACTAMASE.....	147
IV - L'ETABLISSEMENT DE LA TOPOGRAPHIE D'UNE PROTEINE MEMBRANAIRE NECESSITE L'EMPLOI DE PLUSIEURS TECHNIQUES.....	147
FICHES TECHNIQUES	149
FICHE TECHNIQUE N° 1	150
SOUCHES ET MILIEUX	
1°) LES SOUCHES	150
2°) MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	150
FICHE TECHNIQUE N°2	152
PRINCIPAUX PLASMIDES UTILISES	
FICHE TECHNIQUE N°3	153
TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	
1°) TRANSFORMATION	153
2°) PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE	153
3°) ENZYMES DE RESTRICTION ET DE MODIFICATION	153
4°) ELECTROPHORESE ET PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN	153
5°) SEQUENÇAGE NUCLEOTIDIQUE.....	154

FICHE TECHNIQUE N°4	155
FUSIONS DE GENE AVEC LA β-LACTAMASE	
1°) CONSTRUCTION DES DELETIONS A L'AIDE DE L'EXONUCLEASE III.....	155
2°) ANALYSE DES CLONES RECOMBINANTS	155
3°) DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES D'AMPICILLINE.....	156
4°) DOSAGES DE L'ACTIVITE β -LACTAMASE.....	156
FICHE TECHNIQUE N°5	157
MARQUAGE ET EXTRACTION DU MDO	
1°) MARQUAGE AU [2- ³ H] GLYCEROL.....	157
2°) MARQUAGE AU D-[U ¹⁴ C] GLUCOSE.....	157
FICHE TECHNIQUE N°6	159
DOSAGE « IN VIVO » DE L'ACTIVITE DE MdoH	
1°) PERMEABILISATION DES CELLULES	159
2°) ANALYSE DES PRODUITS FORMES	159
FICHE TECHNIQUE N°7	160
MUTAGENESE DIRIGEE	
1°) PRINCIPE DE LA METHODE DE KUNKEL.....	160
2°) LA MUTAGENESE EFFECTUEE SUR <i>mdoH</i>	160
FICHE TECHNIQUE N°8	162
MARQUAGE DES PROTEINES AU ³⁵S	
1°) PRINCIPE.....	162
2°) LA PREPARATION DES CELLULES.....	162
3°) LE MARQUAGE ET LA REVELATION DES PROTEINES.....	163
FICHE TECHNIQUE N°9	
DOSAGE DE L'ACTIVITE β-LACTAMASE CHEZ <i>Bacillus subtilis</i>	164
7 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167
8 - RESUME	183

AVANT - PROPOS

Le travail présenté ici concerne principalement l'étude du gène *mdoH* nécessaire à la biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés d'*Escherichia coli*. Grâce à l'utilisation d'une technique de fusion de gènes avec la β -lactamase, il a été déterminé la localisation membranaire ainsi que la topographie de la protéine MdoH. De plus, une nouvelle technique permettant la détection de l'activité de MdoH a été entreprise.

Dans une partie annexe, il est rapporté l'étude de la topographie de la protéine SpoIIGA de *Bacillus subtilis*, par la même technique de fusion de gènes avec la β -lactamase.

Enfin, dans une conclusion générale sont regroupées les différentes observations critiques de la technique appliquée aux deux protéines précédentes.

1 - INTRODUCTION

Pouvoir communiquer avec le monde environnant constitue une nécessité pour tout organisme vivant. Ce maintien en « éveil » s'effectue par l'émission et la réception de signaux spécifiques, moyens par lesquels l'organisme pourra à tout instant évaluer les qualités du milieu et modifier son comportement en fonction des besoins.

La cellule bactérienne, organisme autonome, doit pouvoir assurer sa survie en transformant, de façon sélective, le « bruit » extérieur en information. Cette information, amplifiée, intégrée, sera, le plus souvent, suivie d'une réponse adaptative appropriée. Soumise fréquemment à des modifications brutales de son environnement (variations de l'osmolarité, du pH, de la température, etc...), la cellule bactérienne a développé des capacités de réaction et de « prise de décision » rapides et élaborées.

Les molécules les plus sollicitées dans ses réponses sont, sans aucun doute, les protéines membranaires. Placées à l'interface entre deux milieux, elles peuvent participer à l'intégration d'une information et à la transmission d'une réponse. La spécificité des fonctions que peuvent remplir ces protéines est notamment liée à leur organisation dans la membrane.

Chez les bactéries à Gram négatif, en réponse à une baisse de l'osmolarité du milieu extérieur, on remarque notamment une accumulation de glucanes dans le périplasme. Chez *Escherichia coli*, la voie de biosynthèse proposée pour ces glucanes nécessite un passage de ceux-ci du cytoplasme vers le périplasme. L'étude de la protéine membranaire MdoH, rapportée ici, va nous permettre de mieux appréhender le ou les mécanismes responsables de cette étape cruciale.

I : PRESENTATION SOMMAIRE DE L'ENVELOPPE D'*Escherichia coli*

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* possède une enveloppe constituée de deux membranes, la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Entre celles-ci se situe le périplasme (Figure 1 page 10).

A) LES COMPOSES LIPIDIQUES DE L'ENVELOPPE

1°) LES PHOSPHOLIPIDES

Il existe 3 types différents de phospholipides chez *E. coli* : la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le diphosphatidylglycérol (encore appelé cardiolipide). La proportion moyenne de ses 3 phospholipides varie en fonction des conditions de culture.

La membrane interne est constituée d'une bicouche lipidique symétrique dans laquelle les molécules de phosphatidyléthanolamine sont majoritaires.

La membrane externe est asymétrique dans sa composition : les phospholipides constituent uniquement la couche interne et le lipopolysaccharide la couche externe. On notera simplement que la proportion de phosphatidyléthanolamine est très largement majoritaire.

2°) LE LIPOPOLYSACCHARIDE

Le lipopolysaccharide (LPS) est constitué de trois parties distinctes : une partie hydrophobe (le lipide A), une partie centrale hydrophile oligosaccharidique (le coeur), et une chaîne latérale polysaccharidique hydrophile (l'antigène O, absent des souche d'*E. coli* K12, B, C, communément utilisées en laboratoire ; Schnaitman et Klena, 1993). Cette composition particulière permet au LPS de jouer un rôle de barrière face à des composés de nature hydrophile ou hydrophobe.

Le lipide A fait partie de la bicouche lipidique. C'est un glycolipide constitué de deux unités de N-acétylglucosamines liées par une liaison β ,1-6. Une unité est pyrophosphorylée, l'autre est phosphorylée. Ces unités portent en tout 6 chaînes d'acides gras.

Le coeur du LPS contient deux sucres spécifiques : le KDO (acide 2-céto-3-désoxyoctonique) et le L-glycéro-D-mannoheptose. Il contient aussi divers sucres communs, comme le glucose, le galactose, et la N-acétyl-D-glucosamine.

L'antigène O est constitué par la répétition d'un ou deux motifs de 3 à 6 sucres. Le nombre de répétitions est variable à l'intérieur d'une même souche. Ceci permet à la cellule de présenter de subtiles variations à sa surface. De plus, la grande diversité de sucres et les différents substituants qui peuvent être placés sur ces derniers, permettent à l'antigène O de participer à la charge nette de la surface bactérienne.

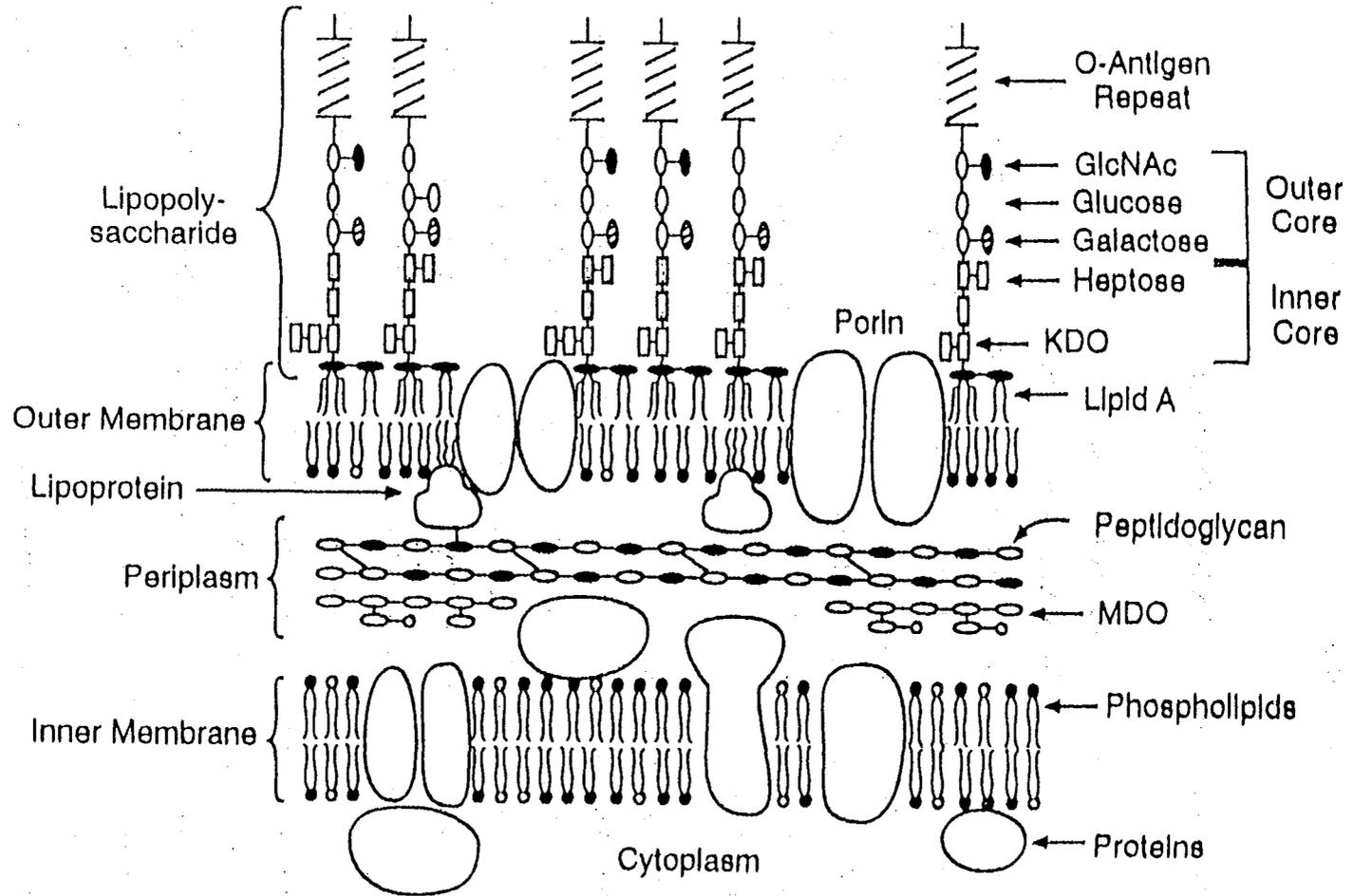


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe d' *Escherichia coli* (d'après Raetz, 1993)

Le LPS contribue au maintien de l'intégrité de la membrane externe. Grâce aux nombreuses charges, présentes sur le lipide A et dans la partie interne du coeur, il est polyanionique. Il peut donc fixer des cations (Mg^{2+} , Ca^{2+}) qui permettent de lier de façon électrostatique des molécules adjacentes de LPS (Nikaido et Vaara, 1987).

Les composés lipidiques de l'enveloppe d'*E. coli* ne sont pas les seuls constituants des deux membranes. Ces deux membranes contiennent aussi de nombreuses protéines. Dans la membrane interne on trouve notamment des protéines nécessaires à la biosynthèse des phospholipides, du peptidoglycane et du LPS. Dans cette membrane, le pourcentage en masse de protéines atteint 70%. Quand à la membrane externe, elle renferme principalement des porines et des récepteurs.

B) LES PRINCIPALES PROTEINES DE L'ENVELOPPE

1°) LES PROTEINES DE LA MEMBRANE INTERNE

Il a été mis en évidence plus de 200 protéines différentes dans la membrane cytoplasmique d'*E. coli*. Pour localiser une protéine dans la membrane, deux moyens ont été envisagés par la cellule : le premier consiste à insérer des protéines dans la bicouche lipidique (ces protéines sont dites intrinsèques), et le deuxième consiste à utiliser les interactions de type électrostatique pour maintenir une protéine à la surface de la membrane (ces protéines sont dites extrinsèques ou périphériques). La plupart de ces différentes protéines peuvent être regroupées en fonction de leur rôle biologique.

a) Le transfert d'électrons, la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP

Le transfert d'électrons est la source d'énergie essentielle à la synthèse de l'ATP. Ce transfert d'électrons s'effectue au niveau de la membrane grâce à plusieurs protéines. Il est couplé à un transport actif de protons vers le périplasma (Ingledeew et Poole, 1984). La synthèse de l'ATP est, quant à elle, effectuée par l'ATP synthase membranaire grâce à la diffusion des protons du périplasma vers le cytoplasme (Shechter, 1984).

b) Le transport de solutés

α) La diffusion facilitée

La diffusion facilitée de solutés, implique l'intervention de protéines qui sont dites transporteurs. Comme exemple de diffusion facilitée on ne connaît que le cas du glycérol.

β) Le transport actif

Ce type de transport nécessite de l'énergie. Il est utilisé par *E. coli* pour transporter différents nutriments comme par exemple le lactose et le maltose. Les protéines membranaires mises en jeu dans ces deux transports seront décrites dans la partie III de l'introduction.

g) Le système PTS

Le système PTS, « phospho transférase system », permet le transport de nombreux sucres (glucose, fructose, mannitol,...) à travers la membrane cytoplasmique. Il consiste à transporter une molécule tout en la phosphorylant. La molécule donnant le phosphate est toujours le phosphoénolpyruvate. Une fois phosphorylée, la molécule ne peut plus retraverser la membrane contrairement à la molécule non phosphorylée.

c) La sécrétion des protéines

La voie générale de sécrétion des protéines fait intervenir les protéines Sec. Ces protéines sont impliquées dans la sécrétion des protéines ayant une séquence signal à leur extrémité aminée. Ces protéines peuvent être des protéines périsplasmiques, des protéines de la membrane externe, ou encore des protéines extra-cellulaires. Les protéines Sec sont aussi impliquées dans la mise en place d'une partie des protéines membranaires. En effet, dans certains cas, l'insertion de segments de protéines dans la membrane nécessite des protéines Sec (Gafvelin et von Heijne, 1994). Le système Sec fait intervenir 6 protéines SecA, SecB, SecD, SecE, SecF et SecY. Parmi celles-ci, SecD, SecE, SecF et SecY sont membranaires, SecA est une protéine périphérique, et seule SecB est libre dans le cytoplasme (Pugsley, 1993).

Il est à noter qu'il existe aussi une voie de sécrétion des protéines qui est indépendante du système Sec, et qui est utilisée par *E. coli* pour sécréter notamment l'hémolysine (Blight et Holland, 1990). Enfin, Salmond et Reeves (1993) ont proposé une troisième voie de sécrétion qui possèderaient des caractéristiques communes aux deux voies précédentes.

d) Le chimiotactisme

E. coli est sensible au gradient de concentration en composés attractifs et répulsifs, et possède la capacité de se déplacer vers l'un plutôt que l'autre. Les protéines impliquées dans la perception de ce gradient, ainsi que celles qui sont nécessaires à l'orientation d'*E. coli* sont, pour certaines d'entre elles, membranaires. La détection de ce gradient est effectuée par des protéines membranaires acceptrices de méthyle. Il s'agit des protéines Tsr, Tar, Trg et Tap. Ensuite, l'information est intégrée par les différentes protéines Che qui gouvernent la rotation du flagelle (Parkinson, 1993).

2°) LES PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE

Dans la membrane externe, on trouve quelques protéines majeures (en quantité importante), et de multiples protéines mineures (en quantité plus faible).

a) Les protéines majeures

α) La lipoprotéine de Braun

La lipoprotéine de Braun est une protéine dont l'extrémité aminée est substituée par deux acides gras (voir page 41). Elle est présente sous une forme libre, et sous une forme liée au peptidoglycane grâce à une liaison covalente impliquant son résidu carboxylique. C'est la plus abondante des protéines de la cellule. Elle participe au maintien de l'intégrité de l'enveloppe en liant le peptidoglycane de manière covalente à la membrane externe.

A côté de la lipoprotéine de Braun, *E. coli* possède d'autres lipoprotéines, comme par exemple, la lipoprotéine Pal (lipoprotéine associée au peptidoglycane).

β) La protéine OmpA.

La protéine OmpA participe elle aussi au maintien de la stabilité membranaire, et sert de récepteur à différents phages. Elle est composée de deux domaines distincts : sa partie aminée est transmembranaire, tandis que sa partie carboxylique est périplasmique. Des études de prédiction de structure secondaire de OmpA montrent que son domaine transmembranaire est organisé en 8 feuilletts β . Ceux-ci sont caractéristiques des protéines localisées dans la membrane externe (Murphy et coll., 1990).

γ) Les porines

On trouve dans la membrane externe des canaux protéiques permettant le passage par simple diffusion, peu spécifique, de petites molécules hydrophiles (d'une masse inférieure à 600 daltons) : les porines. Les porines majoritaires chez *E. coli* sont OmpC, OmpF, et PhoE. Une organisation en trimère a été démontrée pour ces trois porines. Des études de cristallographie réalisées sur les porines OmpF et PhoE, confirment l'association de ces dernières en trimères de sous-unités identiques. La chaîne peptidique constituant chaque sous-unité est organisée en 16 feuilletts β antiparallèles. Ces feuilletts forment une structure cylindrique traversant la membrane et matérialisent ainsi le canal de diffusion caractéristique des porines (Nikaido, 1992 ; Cowan et coll., 1992).

b) Les protéines mineures

De nombreuses autres protéines sont présentes, en plus faible quantité, dans la membrane externe. Elles ont la plupart du temps des fonctions de récepteurs de voies de transport spécifique, et sont souvent parasitées par des bactériophages et / ou des colicines. Quelques-unes de ces protéines sont indiquées dans le tableau I (page 14). Il est intéressant de noter que ces protéines sont toutes insérées dans la membrane grâce à plusieurs feuilletts β .

Récepteurs	Substrats	Substrats parasites	Références
FhuA	ferrichrome	phages ϕ 80, T1 et T5 colicine M albomycine	Killmann et Braun, 1992
FepA	entérochéline	colicines B et D	Lundrigan et Kadner, 1986
BtuB	vitamine B12	colicines A, E1, E2 et E3	Heller et coll., 1985
Tsx	nucléosides et désoxynucléosides	colicines 5 et K phage T6	Bradley et Howard, 1992

Tableau I : Exemples de récepteurs localisés dans la membrane externe d'*E. coli*.

L'entrée des macromolécules telles que la vitamine B12 ou les ferrichromes, nécessite un système de translocation dépendant de l'énergie, appelé système Ton (Larsen et coll., 1994). Ce système est composé de trois protéines : TonB, ExbB et ExbD. TonB est ancrée dans la membrane cytoplasmique par un segment transmembranaire et possède une région centrale rigide qui lui permettrait de traverser le périplasme. ExbB et ExbD sont aussi ancrées dans la membrane cytoplasmique, mais ExbB dispose la majeure partie de ses résidus dans le cytoplasme, alors que ExbD l'expose dans le périplasme (Kampfenkel et Braun, 1992 ; Kampfenkel et Braun 1993). Ce système de translocation peut être parasité par des colicines et des bactériophages.

Il existe un deuxième système de translocation, appelé système Tol, qui participe au maintien de l'intégrité de l'enveloppe d'*E. coli* (Webster, 1991). Ce système est constitué de quatre protéines : TolA, TolB, TolQ et TolR. TolA présente les mêmes caractéristiques que TonB. TolQ et TolR sont fortement homologues (75 %) à ExbB et ExbD respectivement. Enfin, TolB est une protéine périplasmique dont il a été récemment démontré qu'elle entretenait des interactions avec la lipoprotéine Pal (Bouveret et coll. 1995).

C) LES STRUCTURES ANNEXES DE L'ENVELOPPE

La membrane externe n'est pas la couche la plus externe de l'enveloppe d'*E. coli*. En effet, celle-ci est souvent recouverte par une couche capsulaire additionnelle. De plus, des appendices comme des flagelles, des pilis, sont ancrés dans l'enveloppe cellulaire. Ces structures annexes de l'enveloppe sont des éléments spécialisés offrant une plus grande autonomie aux bactéries.

1°) LA CAPSULE

Il s'agit d'une structure polysaccharidique chargée négativement, qui entoure la membrane externe de certaines souches d'*E. coli*. La capsule peut représenter jusqu'à quatre fois le volume de la bactérie. Chez *E. coli* K1, elle est constituée d'un polymère où chaque monomère est formé d'environ 200 résidus d'acide sialique liés en $\alpha,2-8$ (Weisgerber et Troy, 1990).

2°) FLAGELLES ET PILIS

α) Les flagelles

Il s'agit d'un organe moteur permettant le déplacement des bactéries. La distribution des flagelles autour de la bactérie est de type péritriche chez *E. coli*. Un flagelle se présente sous une forme hélicoïdale. Il est constitué d'un filament protéique (formé de flagelline, protéine très rigide) relié par un crochet flexible à un corps basal qui se termine par un anneau enchâssé dans la membrane cytoplasmique. Cet ensemble peut tourner dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans

le sens opposé, ceci afin de se déplacer vers des lieux favorables à la croissance ou pour échapper à des environnements hostiles.

β) Les pilis

Les pilis communs, ou pilis de type 1, sont des appendices communément retrouvés chez les entérobactéries. Ces appendices sont impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion des bactéries aux cellules eucaryotes. Le pili de type 1 d'*E. coli* K12, reconnaît des résidus de mannose et est composé d'unités protéiques répétées : les protéines majeures (dont la masse varie de 17 à 21 kDa). Des unités mineures (28 à 31 kDa) viennent se greffer sur ces dernières. Elles sont localisées à l'extrémité du pili ou à intervalles réguliers, tout au long de celui-ci. Ce sont les sous-unités mineures qui sont impliquées dans la liaison sur les cellules eucaryotes et qui sont aussi appelées adhésines (Hultgren et coll., 1993).

Les pilis sexuels sont quant à eux impliqués uniquement dans la reconnaissance des bactéries lors de la conjugaison. Ces pilis participent à l'attachement des partenaires.

D) LE PERIPLASME

Il s'agit du compartiment cellulaire délimité par les deux membranes. Dans les conditions physiologiques de croissance en laboratoire, il représente 20 à 40 % du volume cellulaire total. Le périplasme constitue la deuxième barrière séparant le cytoplasme du milieu extérieur. Ce rôle de barrière, ou plus exactement de protection, n'est pas aussi discriminatoire que celui joué par les deux membranes, mais il est tout aussi spécifique grâce aux différentes protéines qu'il contient.

En plus de protéines, on trouve dans le périplasme le peptidoglycane (voir ci-dessous) et des glucanes (voir partie II de l'introduction).

1°) LE PEPTIDOGLYCANE

La muréine contient deux couches monomoléculaires de peptidoglycane en phase exponentielle de croissance des bactéries, et trois en phase stationnaire. Elle constitue ainsi une sorte de « squelette » de la bactérie. De par sa rigidité, elle donne sa forme à la cellule, tout en lui permettant de résister aux pressions.

La molécule de peptidoglycane est un hétéropolysaccharide complexe formé par la répétition d'une unité de base composée d'un disaccharide et d'un térapeptide. Le disaccharide est formé par l'association de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique reliés par des liaisons glycosidiques β ,1-4. Le térapeptide est constitué, chez *E. coli*, de L-alanine, de D-glutamine, d'acide méso-diaminopimélique (DAP) et de D-alanine. Ces unités sont reliées entre elles et participent à l'édification de la molécule réticulée de peptidoglycane, formant un gel plus ou moins

épais. Ce gel est attaché à la membrane externe par des liens covalents faisant intervenir notamment la lipoprotéine de Braun.

Dans le périplasma, les deux membranes peuvent être interconnectées par des zones d'adhésion ou jonctions de Bayer. Ces jonctions n'ont été observées que durant la phase de croissance des bactéries. On ne connaît pas la durée de vie de telles structures, et elles pourraient être éphémères, si l'établissement des jonctions n'est réalisé que lors de besoins ponctuels de la cellule. Ces jonctions de Bayer pourraient être des sites d'exportation vers la membrane externe de composés nouvellement synthétisés, comme les polysaccharides, des protéines, ou le LPS, et pourraient être avoir une fonction détournée en permettant l'entrée de l'ADN phagique dans la cellule.

2°) LES PROTEINES

Les nombreuses protéines du périplasma peuvent être liées, soit à la membrane interne, soit à la membrane externe, soit au peptidoglycane, ou encore libres dans le compartiment cellulaire. Elles ont diverses fonctions :

a) Des fonctions de détoxification

Ces protéines inactivent des composés toxiques (antibiotiques, toxines,...). On peut citer par exemple, les enzymes de la famille des β -lactamases qui dégradent les pénicillines. On peut aussi considérer les protéases responsables de l'hydrolyse de protéines anormales comme des enzymes de détoxification (Ichihara et coll., 1993).

b) Des fonctions de recyclage

Elles interviennent pour hydrolyser des molécules complexes en précurseurs qui seront utilisés par la cellule. On trouve par exemple des phosphatases, des protéases,...

c) Des fonctions de transport

Ces protéines sont affines pour des substrats spécifiques et se lient à eux pour leur faire traverser le périplasma. Elles interagissent ensuite avec une protéine de la membrane interne, qui sert de transporteur pour le substrat et permet l'entrée de ce dernier dans le cytoplasme. On peut citer comme exemple les protéines affines pour des sucres, des acides aminés, ou pour des vitamines. Certaines de ces protéines affines sont également impliquées dans le chimiotactisme (la protéine affine pour le maltose interagit avec la protéine Tar, celle affine pour le ribose et celle affine pour la galactose interagissent avec la protéine Trg ; Parkinson, 1993).

d) Des fonctions biosynthétiques

Il s'agit par exemple des protéines intervenant dans les étapes finales de polymérisation des sous-unités du peptidoglycane, ou dans les étapes finales de la substitution des glucanes (voir partie II de l'introduction).

On peut aussi inclure dans cette catégorie les protéines Dsb, impliquées dans la formation des ponts disulfures (Bardwell, 1994), ainsi que la protéine Rot possédant une activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (Liu et Walsh, 1990).

II : LES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES

Des glucanes sont présents dans le périplasme des bactéries à Gram négatif (Schulman et Kennedy, 1979). La quantité de ces glucanes dépend de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries. Plus l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries est basse, plus la quantité de glucanes accumulés est élevée. Chez *E. coli*, ils peuvent représenter jusqu'à 5 % du poids sec des bactéries. Ces glucanes pourraient jouer un rôle dans la protection du cytoplasme. Jusqu'à présent, ils ont été peu étudiés, sauf chez les Rhizobiacées et chez *E. coli*. Les analyses structurales effectuées démontrent que le glucose est le seul constituant de nature saccharidique. Certaines unités de glucoses peuvent être substituées par des résidus succinates, et plus fréquemment par des résidus phosphoglycérols et phosphoéthanolamines provenant des phospholipides.

Notre groupe étudie la voie de biosynthèse des glucanes d'*E. coli*, dénommés MDO. Nos études ont débuté par l'analyse génétique du locus nécessaire aux premières étapes de la biosynthèse du MDO. Les progrès effectués nous ont conduit à nous intéresser aux glucanes d'autres genres bactériens. Non seulement de nouveaux gènes gouvernant la biosynthèse de ces glucanes ont été découverts, mais aussi de nouvelles structures glucidiques. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous amène aujourd'hui à proposer que ces glucanes constituent une famille de composés ubiquistes des bactéries à Gram négatif : les Glucanes Périplasmiques Osmorégulés, ou GPO.

A) LE MDO D'*Escherichia coli*

1°) DECOUVERTE ET STRUCTURE

a) Découverte

C'est en étudiant le renouvellement des têtes polaires des phospholipides, que van Golde et coll. (1973) ont identifié un nouveau constituant d'*E. coli* de nature oligosaccharidique. Ce nouveau constituant accepte la radioactivité spécifique du phosphoglycérol, provenant du marquage des molécules de phosphatidylglycérol et de cardiolipide.

Une étude sommaire de la composition de ce nouveau constituant a montré qu'il ne contient aucun acide gras, qu'il est insoluble dans les solvants organiques tel que le chloroforme, et qu'il est soluble dans l'eau. En plus de la présence de résidus de phosphoglycérol, il a été montré l'existence de résidus de succinates. Enfin, l'unique molécule de nature saccharidique est le glucose (van Golde et coll., 1973).

Ces oligosaccharides étant constitués de résidus de phosphoglycérols, issus des phospholipides membranaires, ils sont dénommés : « membrane derived oligosaccharides » (MDO).

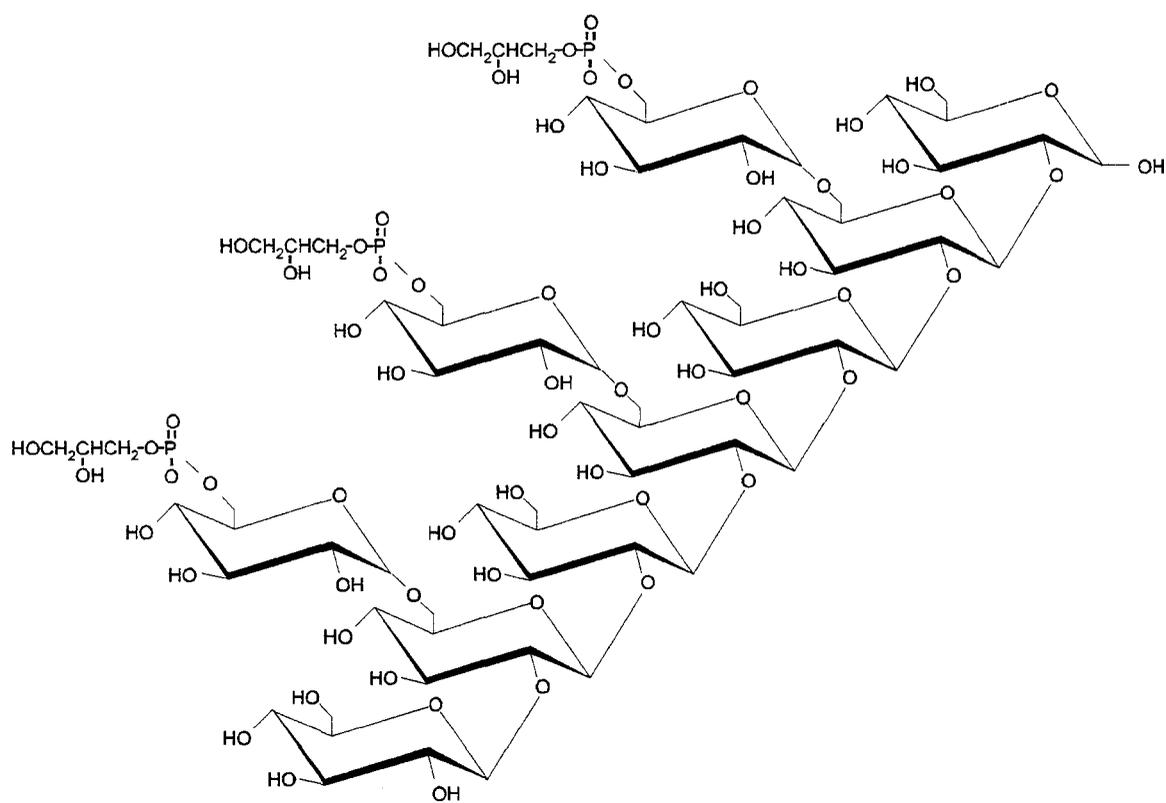


Figure 2 : Modèle structural d'une molécule de MDO

b) Structure

L'origine phospholipidique des résidus de phosphoglycérol a été confirmée par la mise en évidence de la nature exacte de ces résidus : les *sn*-1-phosphoglycérols (Kennedy et coll., 1976). De plus, les mêmes auteurs ont identifié un nouveau constituant du MDO : la phosphoéthanolamine. Ce nouveau constituant, ainsi que le *sn*-1-phosphoglycérol, seraient majoritairement liés au carbone 6 des résidus de glucose. Ces derniers sont au nombre de 6 à 12 résidus par molécule de MDO, les espèces majoritaires présentant 8 et 9 unités de glucose (Kennedy, 1987). Ces unités de glucose ne sont liées les unes aux autres que par des liaisons de type β ,1-2 et β ,1-6 (Schneider et coll., 1979). Un modèle de la structure du MDO est représenté sur la figure 2.

2°) GENES ET PROTEINES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE

a) Identification du précurseur glucidique : l'UDP-glucose

C'est en testant différentes souches mutantes pour des locus impliqués dans la biosynthèse des nucléotides diphosphate sucres, que Schulman et Kennedy (1977) ont mis en évidence que l'UDP-glucose est l'unique précurseur saccharidique du MDO. Il est important de retenir qu'une souche *galU* ne peut pas synthétiser de MDO. De même, une souche *pgi*, *zwf* (incapable de synthétiser ou de dégrader le glucose), ne peut synthétiser du MDO qu'en présence de glucose ajouté dans le milieu de culture (Figure 3, page 22).

b) Révélation d'une activité glucosyltransférase nécessitant l'UDP-glucose

En 1984, Weissborn et Kennedy ont mis au point un système *in vitro* d'élongation de chaînes de glucose liés en β ,1-2. Ce système nécessite une fraction membranaire, une fraction soluble (thermorésistante et sensible à la trypsine), une amorce de type β -glucoside, et utilise l'UDP-glucose comme substrat. Ce système *in vitro* est spécifique du MDO, puisque l'unique mutant de la voie de biosynthèse du MDO alors connu, *mdoA1* (Bohin et Kennedy, 1984), ne peut pas synthétiser de chaînes de glucose liés en β ,1-2 à cause d'une fraction membranaire inactive (Weissborn et Kennedy, 1984).

Il est important de noter que le mutant *mdoA1* (et a posteriori tous les autres mutants) ne présente aucun phénotype de croissance marqué. Il est donc nécessaire pour déterminer la présence ou l'absence de MDO, de réaliser le dosage systématique de l'extrait contenant le MDO, après avoir effectué un marquage spécifique au glycérol, tritié en 2, des différentes souches à tester.

La fraction soluble a été plus particulièrement étudiée. Il a ainsi été démontré que dans cette fraction, la seule molécule nécessaire au système *in vitro* était l'Acyl Carrier Protein (ACP). Par la suite, Thérissod et Kennedy (1987) ont précisé que le groupe prosthétique phosphopanthéine n'était

pas nécessaire pour le rôle que jouait l'ACP dans cette réaction. Ceci peut paraître très surprenant, car jusqu'à présent tous les rôles démontrés pour l'ACP mettaient en jeu le résidu thioester de la partie phosphopanthéine. Enfin, Bayan et Thérissod (1989a) ont démontré qu'une partie de l'ACP était localisée dans la membrane cytoplasmique, et que cette localisation pouvait être due à des interactions avec des protéines membranaires (Bayan et Thérissod, 1989b).

Ainsi, les premières étapes de la voie de biosynthèse du MDO nécessitent l'UDP-glucose, une fraction membranaire *mdoA*⁺, de l'ACP et probablement une amorce dont la nature n'a jamais été identifiée *in vivo*.

b) La biosynthèse du squelette nécessite le locus *mdoA*

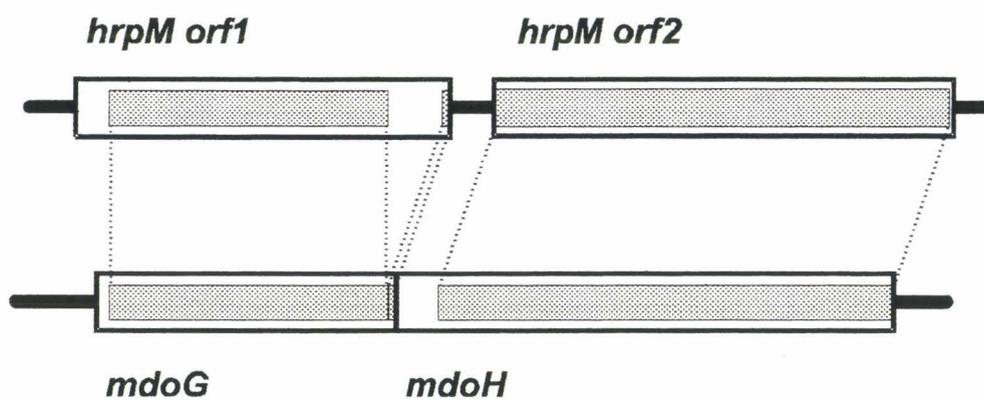
La mutation *mdoA1* a permis de localiser le locus *mdoA* au niveau de la minute 23 sur la chromosome d'*E. coli*. Ce locus a été cloné par Lacroix et coll. (1989). Il s'agit d'un opéron de 2 gènes *mdoG* et *mdoH*. Une mutation dans l'un ou l'autre de ces gènes est suffisante pour abolir la biosynthèse du MDO (Lacroix et coll., 1991). Le séquençage nucléotidique de ces deux gènes a été réalisé (Loubens et coll., 1993). Le gène *mdoG* présente une phase ouverte de lecture de 489 codons. La séquence en acides aminés déduite présente, à son extrémité aminée, une séquence dont les caractéristiques sont très proches des caractéristiques d'une séquence signal. La localisation périplasmique de MdoG a d'ailleurs été confirmée expérimentalement (Loubens et coll. 1993). Cependant, aucune fonction précise n'a pu être associée à cette protéine.

Le gène *mdoH* présente une phase ouverte de lecture d'au plus 847 codons. En effet, le séquençage nucléotidique a révélé 3 codons différents à partir desquels pouvait débiter la traduction. D'autre part, il a été démontré que seul le gène *mdoH* était nécessaire à la restauration de la biosynthèse du MDO dans une souche *mdoA1*. Ainsi, le composant membranaire issu d'une souche *mdoA1* rendant inefficace le système *in vitro* d'élongation de chaînes de polyglucose, serait la protéine MdoH. Ce système permettant de révéler une activité glucosyltransférase, il sera considéré, dans la suite de ce travail, par approximation, que la protéine MdoH est une glucosyltransférase.

Enfin, le séquençage du locus *mdoGH* a permis de révéler une très forte homologie (69 % sur 3264 nucléotides codants) avec le locus *hrpM* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Le locus de *P. syringae* est impliqué dans la pathogénicité de cette bactérie vis-à-vis de plantes. Ce locus est constitué de deux phases ouvertes de lecture, l'ORF1 et l'ORF2. La première est homologue à *mdoG*, et la deuxième, aussi appelée *hrpM*, est homologue à *mdoH* (Figure 4 page 24). Cette importante homologie se traduit *in vivo* par deux observations complémentaires : une souche d'*E. coli* mutée au niveau du gène *mdoH*, voit la restauration de la biosynthèse de MDO par l'expression du gène *hrpM* (Loubens et coll., 1992) ; réciproquement, une souche de *P. syringae*,

Pseudomonas syringae

1 kb



Escherichia coli

Figure 4 : Représentation schématique de l'homologie entre le locus *mdoGH* d'*E. coli* et le locus *hrpM* de *P. syringae*

Les rectangles représentent les cadres ouverts de lecture, et le grisé symbolise les homologies

mutée au niveau du gène *hrpM*, voit la restauration de sa virulence par l'expression du gène *mdoH* (Williams et coll., 1994). Ainsi, la découverte de cette homologie a permis de préciser que le locus *hrpM* gouverne la biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés de *P. syringae*.

c) La substitution du squelette

α) la phosphoglycérol transférase I

Il s'agit d'une activité enzymatique mise en évidence par Jackson et Kennedy (1983). Cette activité, liée à la membrane cytoplasmique, permet le transfert *in vitro* des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol des phosphatidylglycérols sur les molécules de MDO. Ce transfert de résidus de *sn*-1-phosphoglycérol peut aussi s'effectuer sur des accepteurs artificiels de type β -D-glucoside, tels que l'arbutine (*para*-hydroxyphényl- β -D-glucoside). Le produit secondaire de la réaction est toujours le diacylglycérol. De plus, grâce à l'utilisation de l'arbutine, qui diffuse librement à travers la membrane externe mais qui n'est pas transportée dans le cytoplasme d'*E. coli*, il a été montré que le site actif de cette protéine est localisée sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique (Bohin et Kennedy, 1984).

Le gène codant la phosphoglycérol transférase I, appelé *mdoB*, a été précisément localisé entre la minute 99,2 et 99,4 sur le chromosome d'*E. coli*. (Jackson et coll., 1984 ; Lanfroy et Bohin, 1993). Des mutants *mdoB* sont incapables de transférer des résidus de phosphoglycérol sur l'arbutine, et permettent la biosynthèse de molécules de MDO dépourvues de phosphoglycérols (Jackson et coll., 1984). Le gène *mdoB* a été cloné et séquencé au laboratoire par Eric Lanfroy. Ce gène présente une phase ouverte de lecture sur 776 codons. La séquence en acides aminés déduite, révèle à son extrémité aminée, la présence de 2 régions dont les caractéristiques sont proches de celle d'une séquence signal. La localisation périplasmique de cette protéine a été démontrée par l'utilisation de plusieurs protéines de fusion avec la β -lactamase. La séquence en acides aminés ne présentant aucune région hydrophobe conséquente, et l'activité de cette protéine étant localisée sur la face périplasmique la membrane cytoplasmique, il est donc probable que MdoB soit une protéine périphérique. Actuellement, des études sont en cours pour tenter de préciser quelle est la nature et la régulation du promoteur du gène *mdoB*, et quelle est la nature de l'affinité de la protéine MdoB pour la membrane.

β) La phosphoglycérol transférase II

Cette activité, décrite par Goldberg et coll. (1981), catalyse le transfert de résidus de *sn*-1-phosphoglycérol entre des molécules de MDO. Elle est incapable de transférer des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol à partir des molécules de phosphatidylglycérol. Cette activité enzymatique est donc responsable de la polysubstitution des molécules de MDO par le phosphoglycérol. La protéine

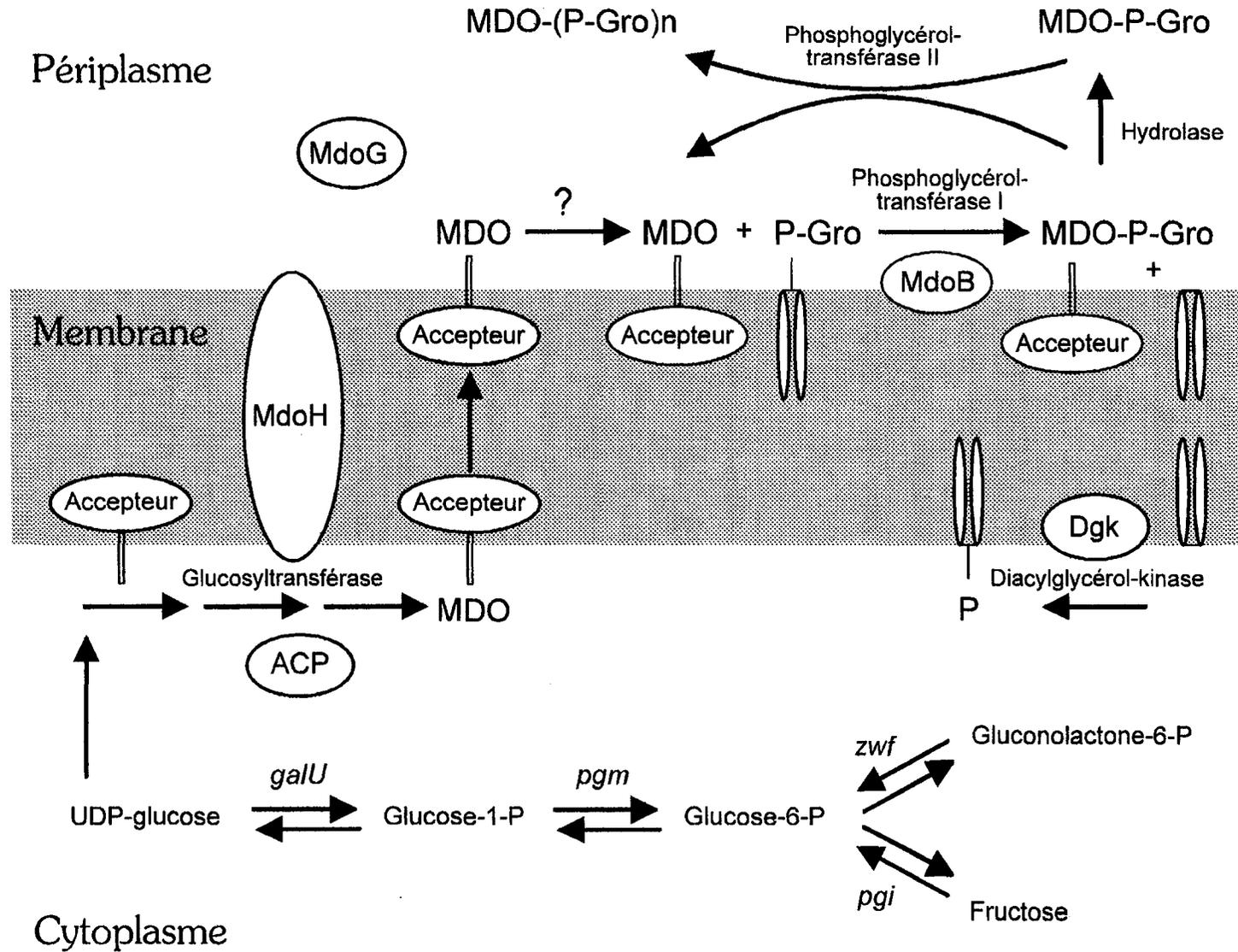


Figure 5 : Modèle proposé pour la voie de biosynthèse du MDO

responsable de cette activité est localisée dans le périplasme, et sa masse moléculaire a été estimée à 56 kDa.

γ) les autres substituants

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été menée pour tenter de définir l'origine des résidus de succinate. Quant aux résidus de phosphoéthanolamine, ils proviennent des têtes polaires des résidus de phosphatidyléthanolamine (Kennedy et coll. 1976), mais ici aussi, aucun gène ni aucune activité enzymatique n'ont été caractérisés.

L'ensemble des travaux effectués pour déterminer la voie de biosynthèse du MDO ont permis d'établir un modèle présenté sur la figure 5 (Goldberg et coll., 1981 ; Bohin et Kennedy, 1984).

3°) LA REGULATION OSMOTIQUE

En 1982, E. P. Kennedy a montré que la quantité de MDO accumulée par des bactéries cultivées dans un milieu de croissance de basse osmolarité (70 mosM), est très importante. Cette quantité peut représenter jusqu'à 5 à 7 % du poids sec des bactéries. Par contre, cultivées dans un milieu de croissance de haute osmolarité (670 mosM), les bactéries n'accumulent plus qu'une faible quantité de MDO (< à 0,5 % ; Figure 6, page 28).

L'expression de l'opéron *mdoGH* est soumise à une régulation par l'osmolarité du milieu de croissance. En effet, l'expression d'une protéine de fusion MdoH-LacZ est 7 fois plus importante à basse osmolarité. De plus, la quantité d'ARN messager de l'opéron *mdoGH* est 5 fois plus importante à basse osmolarité (Lacroix et coll., 1991). Enfin, l'expression d'une fusion de gènes *mdoG-phoA*, placée en copie unique sur le chromosome, est soumise à une régulation par l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries (Loubens, 1993).

D'autre part, Rumley et coll. (1992) ont montré que l'activité *in vitro* d'élongation des chaînes de polyglucose était insensible à l'osmolarité. Par contre, cette activité est inhibée par des concentrations élevées en sels, et elle n'est pas inhibée par des concentrations élevées de bétaine, proline et choline, qui sont des solutés accumulés par *E. coli* dans des conditions de croissance dans un milieu de haute osmolarité. Ces auteurs postulent donc à une régulation d'au moins une activité enzymatique par la variation de la force ionique du périplasme. De plus, ils ont montré que la biosynthèse du MDO dans un milieu de faible osmolarité ne nécessite pas la production d'un niveau élevé des enzymes.

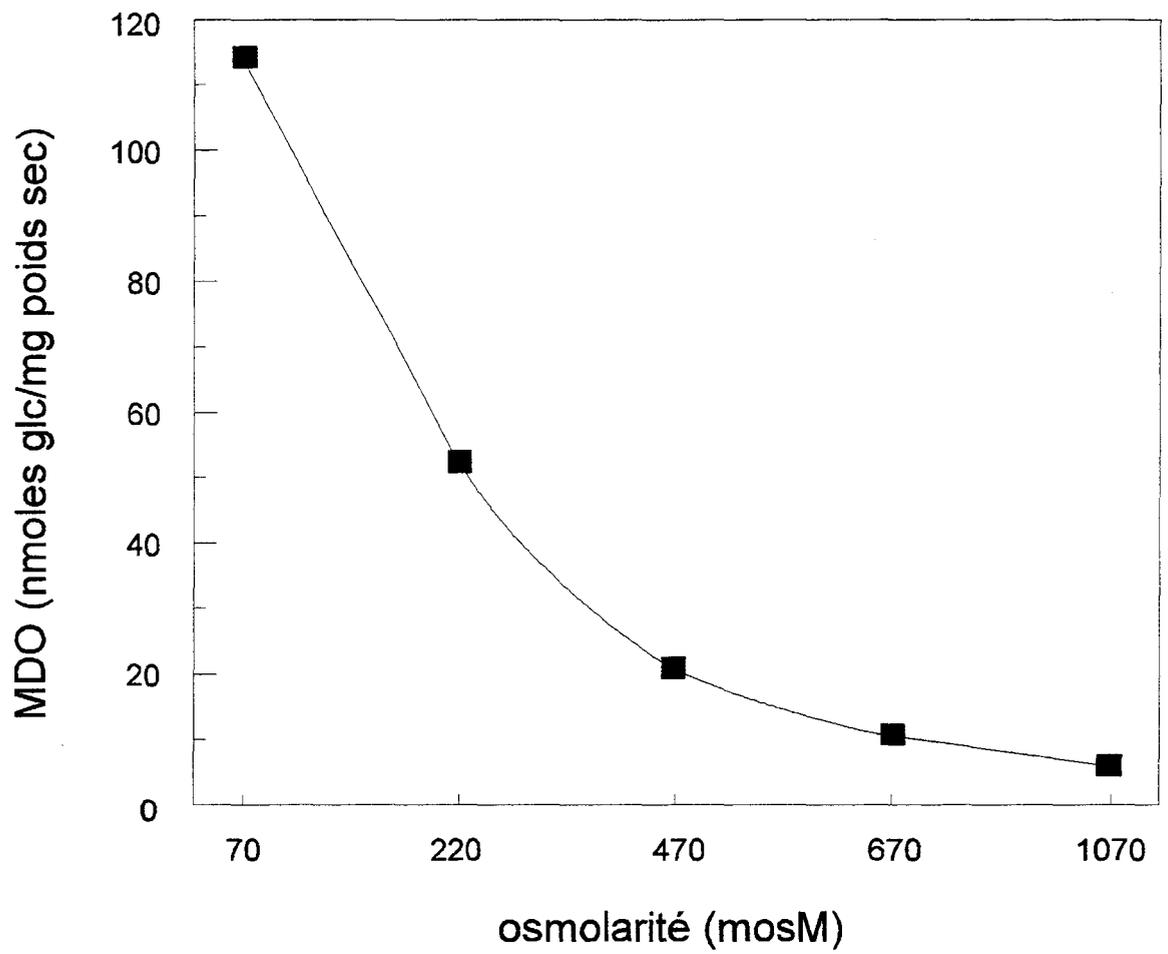


Figure 6 : Régulation osmotique de la quantité de MDO (Bohin et Kennedy, résultats non publiés).

B) LES AUTRES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES CONNUS

1°) LES GLUCANES DE *Pseudomonas syringae*

a) Structure

La structure des GPO de *P. syringae* est en tout point identique à celle des molécules de MDO d'*E. coli*, à une différence majeure près : l'absence totale de substituants. Il s'agit donc d'une famille de glucanes neutres constitués d'un squelette de 6 à 12 unités de glucose liées en $\beta,1-2$ et $\beta,1-6$ (Talaga et coll., 1994).

b) Gènes et protéines de la voie de biosynthèse

Les seules données obtenues sont celles qui ont été identifiées par l'homologie de séquence avec le locus *mdoGH* d'*E. coli*. Il existe donc au moins 2 gènes impliqués dans la biosynthèse des GPO de *P. syringae* : le gène codé par l'ORF1, et le gène *hrpM*.

2°) LES GLUCANES D'*Erwinia chrysanthemi*

a) Structure

La structure des GPO de cette bactérie, très proche d'*E. coli*, est totalement identique à celle des molécules de MDO (P. Talaga, communication personnelle).

b) Gènes et protéines de la voie de biosynthèse

Chez *E. coli*, le locus *mdoGH* est proche du locus *pyrC* (Bohin et Kennedy, 1984). Ainsi, des doubles mutants *pyrC*, *mdoA* d'*E. coli* (incapables de synthétiser du MDO et de croître sur un milieu minimum sans uridine) ont été complétés par une banque de fragments chromosomiques d'*E. chrysanthemi*, par N. Hugouvieux-Cotte-Pattat (URA CNRS 1486, INSA de Lyon). Les clones pouvant croître sur un milieu minimum dépourvu d'uridine ont été testés vis-à-vis de leur capacité à restaurer la biosynthèse du MDO. Un seul clone s'est révélé positif. Son analyse est actuellement effectuée au laboratoire, par Frédéric Page et Sylvia Altabe. Les premiers résultats du séquençage font apparaître que le fragment d'ADN nécessaire et suffisant à la restauration de la biosynthèse du MDO, est constitué de 2 gènes (nommés *opgA* et *opgB*) ayant de fortes homologies avec le locus *mdoGH* d'*E. coli* et le locus *hrpM* de *P. syringae*.

3°) LES GLUCANES DE *Rhizobium meliloti* ET D'*Agrobacterium tumefaciens*

a) Structure

Ces glucanes sont cycliques et composés de 17 à 40 unités de glucose pour *R. meliloti*, et de 17 à 25 pour *A. tumefaciens* (Dell et coll., 1983 ; Hisamatsu et coll., 1983). Ils sont reliés entre eux par des liaisons $\beta,1-2$. Ils présentent un taux important de substitution où le phosphoglycérol est très majoritaire (Miller et coll., 1988).

b) Gènes et protéines de la voie de biosynthèse

Jusqu'à présent, seuls deux gènes ont été identifiés dans la voie de biosynthèse des GPO de ces bactéries. Il s'agit de *ndvA* et *ndvB*, pour *R. meliloti*, et de *chvA* et *chvB* pour *A. tumefaciens*. Ces deux couples de gènes, très homologues, permettent une complémentation interspécifique entre les deux espèces de Rhizobiacées (Dylan et coll., 1986).

Les gènes *ndvA* et *chvA* présentent une phase ouverte de lecture pouvant permettre l'expression d'une protéine respectivement de 67 et 65 kDa. Les séquences en acides aminés déduites mettent en évidence une forte homologie (76 % d'identité) avec plusieurs protéines ayant une fonction de transporteurs affins pour l'ATP (Cangelosi et coll., 1989 ; Stanfield et coll., 1988). Les protéines NdvA et ChvA pourraient donc jouer un rôle dans le transport des GPO à travers la membrane cytoplasmique ou même vers le milieu extérieur. En effet, certaines souches de Rhizobiacées ont la particularité d'excréter dans le milieu extérieur les GPO, ceci dépendant notamment des conditions de culture (Breedveld et coll., 1991).

Les gènes *ndvB* et *chvB* codent des protéines de la membrane cytoplasmique de masse moléculaire très élevée (319 kDa). Elles sont nécessaires aux étapes d'initiation, d'élongation et de cyclisation, sans que leur rôle précis aient été déterminé (Ielpi et coll., 1990 ; Zorreguieta et coll., 1988). On peut toutefois retenir, que ces protéines sont affines pour l'UDP-glucose, unique précurseur de tous les GPO (Zorreguieta et coll., 1986).

Enfin, on peut noter qu'aucune homologie significative n'a pu être mise en évidence, entre les gènes gouvernant la biosynthèse des GPO des Rhizobiacées et ceux gouvernant la biosynthèse des GPO d'*E. coli* et ses homologues.

4°) LES AUTRES GPO RECEMMENT ANALYSES

a) Les GPO de *Bradyrhizobium*

Ce sont des glucanes cycliques formés de 10 à 13 unités de glucoses reliés par des liaisons β ,1-3 et β ,1-6. Ils sont majoritairement neutres, bien qu'il ait été mis en évidence une faible proportion de phosphocholine.

Seule une protéine permettant la synthèse de glucanes *in vitro* a été mise en évidence (Cohen et Miller, 1991 ; Iñón de Iannino et Ugalde, 1993).

b) Les GPO de *Xanthomonas campestris*

Ils s'agit de glucanes cycliques constitués de 16 unités de glucose. Ils présentent l'originalité de posséder 15 liaisons de type β ,1-2 et une liaison de type α ,1-4. Ils sont totalement dépourvus de substituants (Talaga, communication personnelle).

Récemment, il a été réalisé une expérience d'hybridation d'ADN entre un fragment de *X. campestris* impliqués dans la biosynthèse des GPO, et un fragment du gène *ndvB* (Tsuyumu, communication personnelle). Cette hybridation permet de supposer que les gènes impliqués dans la biosynthèse des GPO de *X. campestris* sont homologues à ceux des Rhizobiacées, comme le laissait suggérer la similarité de structure de leurs GPO.

C) LES FONCTIONS DES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES

1°) FONCTION CHEZ *P. syringae*

Les GPO sont indispensables à la manifestation de la virulence de *P. syringae*. Cette virulence se caractérise par l'apparition de taches brunes, traduisant un développement des bactéries, chez les plantes hôtes comme par exemple le haricot. Cette virulence induit aussi une réponse d'hypersensibilité vis-à-vis des plantes non hôtes comme le tabac. Cette dernière se traduit par l'apparition de points de nécrose empêchant la bactérie de se développer.

2°) FONCTION CHEZ *E. chrysanthemi*

Jusqu'à présent aucune fonction n'a été recherchée pour ces glucanes chez *E. chrysanthemi*. Le travail actuellement effectué au laboratoire, va permettre d'obtenir des mutants d'*E. chrysanthemi* déficients dans la synthèse des GPO. Ces mutants permettront de déterminer si, et comment, ces GPO sont impliqués dans la virulence de cette bactérie vis-à-vis de ses plantes hôtes.

3°) FONCTION CHEZ LES RHIZOBIACEES

Chez *A. tumefaciens* les GPO sont indispensables à l'attachement de la bactérie sur sa plante hôte (Puvanesarajah et coll., 1985). Chez *R. meliloti* les GPO sont nécessaires à la formation de nodules compétents pour la symbiose avec les plantes légumineuses (Dylan et coll., 1986). Comme pour le MDO d'*E. coli*, divers rôles, comme le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, ont été attribué aux GPO des Rhizobiacées (Breedveld et Miller, 1994).

4°) HYPOTHESES SUR LA FONCTION DU MDO

Jusqu'à aujourd'hui, aucune fonction déterminante n'a pu être attribuée aux molécules de MDO. Cependant, de nombreuses hypothèses ont été élaborées.

Le premier rôle démontré pour les molécules de MDO est un rôle dans le renouvellement des phospholipides membranaires. Le renouvellement des phospholipides est plus rapide en présence de MDO (Schulman et Kennedy, 1977). Cependant, on ne peut pas distinguer le rôle du MDO dans le renouvellement des phospholipides, de la nécessité pour le MDO d'être substitué pour assurer une

autre fonction. De plus, des mutants incapables de synthétiser du MDO ne révèlent aucun phénotype particulier vis-à-vis de la biosynthèse des phospholipides.

Le deuxième rôle supposé pour le MDO, est un rôle dans le maintien du potentiel de Donnan, dans des conditions de faible osmolarité (Kennedy, 1982). Dans un milieu de faible osmolarité, le périplasme doit maintenir une pression osmotique identique à celle du cytoplasme (Stock et coll., 1977). Pour ceci, il est nécessaire qu'il puisse accumuler des molécules cationiques. Le MDO, polyanion périplasmique non diffusible présent en grande quantité dans des conditions de faible osmolarité, pourrait alors remplir le rôle de contre-ion indispensable au maintien du potentiel de Donnan. Une fois encore, des mutants dépourvus de MDO ne présentent aucun phénotype de croissance marqué dans un milieu de faible osmolarité. Il faut donc envisager qu'en l'absence de MDO, d'autres molécules jouent le même rôle.

Des mutants dépourvus de MDO possèdent un nombre réduit de flagelles, ce qui provoque une baisse de leur mobilité et de leur chimiotactisme (Fiedler et Rotering, 1988). D'autre part, ces mutants présentent une modification de la structure de l'enveloppe qui ne permet plus l'intégration de la protéine de lyse des phages MS2 et ϕ X174, dans la membrane cytoplasmique (Höltje et coll., 1988). Enfin, ces mutants possèdent une quantité de porine OmpF indépendante de l'osmolarité. La quantité de OmpF demeure à un niveau bas dans un milieu de faible osmolarité, niveau identique à celui de souches sauvages cultivées à haute osmolarité (Fiedler et Rotering, 1988). Le MDO participe donc au maintien de l'intégrité de l'enveloppe d'*E. coli*.

En dernier lieu, la récente découverte de la complémentation interspécifique entre les locus *mdoGH* et *hrpM* renforce l'idée, émise par les études effectuées sur les Rhizobiacées, selon laquelle, les glucanes périplasmiques osmorégulés (GPO) sont impliqués dans les relations que la bactérie entretient avec son environnement.

5°) BUT DU TRAVAIL DE THESE

Mon arrivée au laboratoire coïncida avec la fin du séquençage nucléotidique du gène *mdoH*. La séquence en acides aminés déduite a permis d'effectuer un calcul du degré d'hydrophobie de la protéine MdoH. Ces données suggéraient que MdoH puisse être localisée dans la membrane cytoplasmique.

Il me fût alors confié la détermination de la localisation de la protéine MdoH, ainsi que l'étude de sa topographie par l'utilisation de fusions de gènes. Ces résultats devaient nous permettre d'entreprendre l'établissement d'un modèle d'organisation de la protéine MdoH dans la membrane, afin d'envisager la mise en évidence de relations structure-fonction. A côté de la topographie, il était

donc nécessaire de posséder un moyen de révéler l'activité de MdoH. Ainsi, j'ai réalisé la mise au point d'un nouveau système permettant la révélation *in vivo* de l'activité de MdoH.

Dans le but de fournir un bref aperçu des différentes solutions adoptées par les protéines afin qu'elles soient localisées au niveau des membranes, ainsi que les différentes fonctions qui peuvent leur être associées, j'ai regroupé, dans la troisième partie de l'introduction, un ensemble de données essentiellement empruntées aux bactéries.

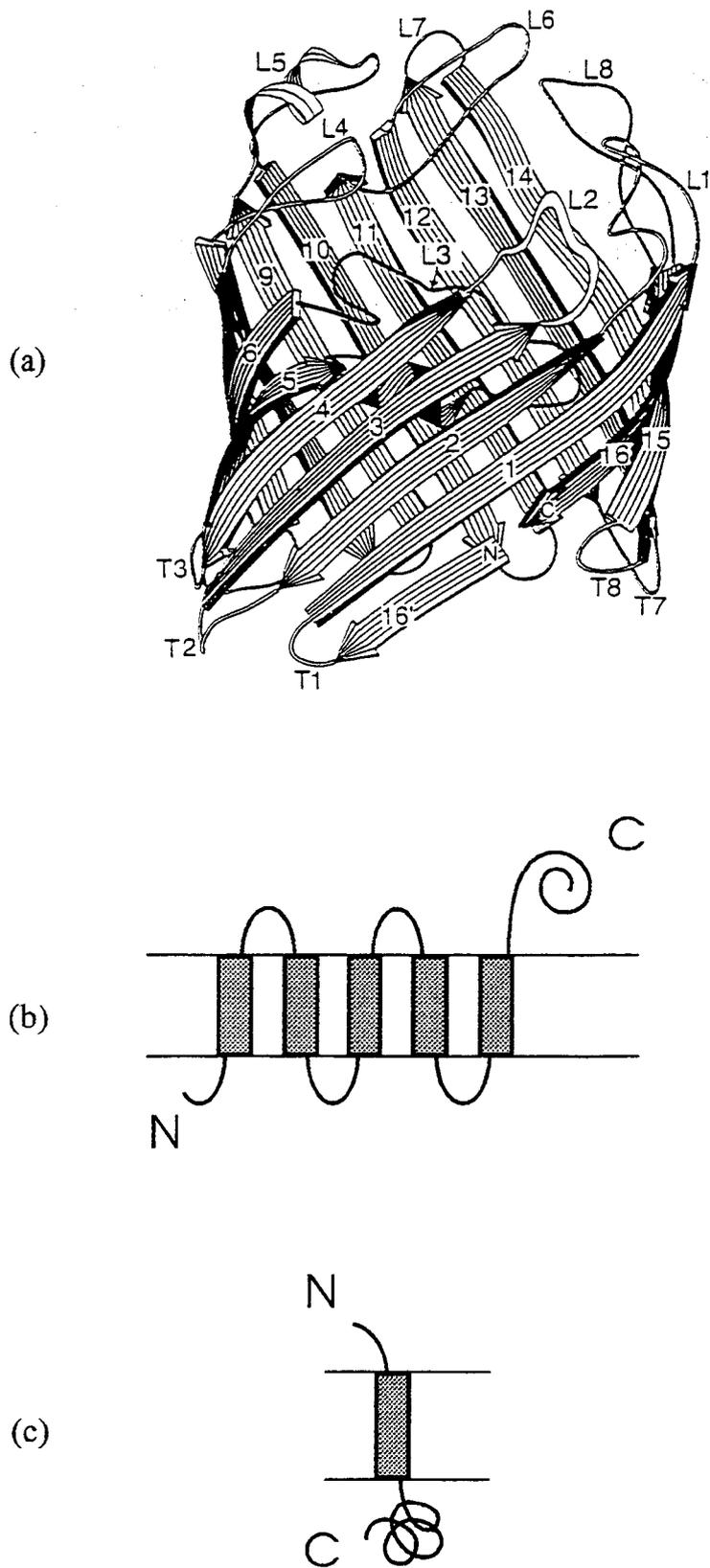


Figure 7 : Représentations schématiques des organisations membranaires :
 a : de la porine OmpF d'*E. coli* (d'après Cowan et coll., 1992)
 b : de la sous-unité M du centre de réaction photosynthétique de *R. viridis*
 c : de la sous-unité H du centre de réaction photosynthétique de *R. viridis*

III : LES DIFFERENTS TYPES DE PROTEINES MEMBRANAIRES

A) LES PROTEINES AYANT PLUSIEURS SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES

1°) LES PORINES

L'analyse en diffraction aux rayons X de cristaux de la protéine OmpF d'*E. coli*, a permis de déterminer l'organisation spatiale de cette protéine (Cowan et coll., 1992). Elle est constituée de 16 feuilletts β anti-parallèles (Figure 7). Des prédictions effectuées sur d'autres porines permettent de conclure qu'elles possèdent toutes la particularité de s'insérer dans la membrane externe grâce à la formation de plusieurs segments organisés sous forme de feuilletts β . Ce type d'organisation n'est pas retrouvé dans les protéines de la membrane cytoplasmique, et semble donc spécifique de la membrane externe (Murphy et coll., 1990). Ce choix d'organisation peut être justifié par la différence de composition des phospholipides, ou par la nécessité de former un pore de diamètre assez grand par rapport aux pores, de taille inférieure, qui peuvent être obtenu par une succession de segments transmembranaires sous forme d'hélice α .

2°) LES CENTRES DE REACTION PHOTOSYNTHETIQUE

Il s'agit d'un complexe de protéines et de cofacteurs qui a pour fonction de transformer l'énergie lumineuse en flux d'électrons puis, en flux de protons qui traverse la membrane cytoplasmique et qui permet ainsi la synthèse d'ATP. Chez la bactérie *Rhodospseudomonas viridis* ce centre de réaction photosynthétique a été cristallisé et sa structure a ainsi pu être établie (Deisenhofer et Michel, 1989). Il est constitué de 4 sous-unités protéiques et de 14 cofacteurs. Les 4 protéines sont les sous-unités H, M, L, et le cytochrome de type *c*. Le corps de ce centre de réaction est localisé au sein de la membrane cytoplasmique. Il est constitué d'un complexe des 2 sous-unités L et M en association avec des cofacteurs. Chacune de ses sous-unités L et M contient 5 segments transmembranaires sous forme d'hélice α . L'extrémité aminée de chacune de ces sous-unités est localisée dans le cytoplasme, alors que l'extrémité carboxylique est située dans le périplasme. La sous-unité H possède un seul segment transmembranaire, proche de son extrémité aminée périplasmique, et un domaine globulaire cytoplasmique qui permet une interaction avec le complexe constitué des deux sous-unités L et M (Figure 7). Quant au cytochrome, il interagit avec le complexe L / M du côté périplasmique.

La cristallisation de ce centre de réaction photosynthétique a permis de mieux comprendre comment s'organise spatialement le transfert des électrons, mais il a permis aussi d'apporter des précisions sur l'organisation des segments transmembranaires sous forme d'hélice α . En effet, les trois sous-unités H, M et L sont les premiers exemples où la position des acides aminés dans les

hélices α transmembranaires est précisément connue. Ainsi, il est possible d'identifier les acides aminés qui sont impliqués dans les interactions avec les phospholipides, et ceux qui sont impliqués dans les interactions existantes entre les différents segments.

Il faut ajouter qu'aujourd'hui seulement 2 autres protéines membranaires, possédant des segments sous forme d'hélices α , ont été cristallisées, et leurs structures au niveau atomique ont été résolues (Picot et coll., 1994 ; Michel et coll., 1995). De plus, l'étude de cristaux à deux dimensions de la bactériorhodopsine d'*Halobacterium halobium* a permis d'identifier la position exacte de ses 7 segments transmembranaires (Henderson et coll., 1990). La résolution de cette structure a nécessité l'emploi de nombreuses mesures physiques, et a bénéficié d'un grand nombre de mutants localisés au niveau de différents acides aminés (Ahl et coll., 1988). Aujourd'hui, la structure de la bactériorhodopsine sert de référence aux études de la structure du pigment visuel, la rhodopsine (Schertler et coll., 1993). Celle-ci est en effet probablement constituée de 7 segments transmembranaires, ainsi que de nombreuses autres protéines ayant toutes des fonctions de récepteurs. Ces protéines forment une famille appelée les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Bockaert, 1995).

3°) LES PROTEINES AYANT UNE FONCTION DE TRANSPORT

a) Les systèmes à un seul composant

Il s'agit de protéines dont la quasi totalité des acides aminés est insérée dans la bicouche lipidique. De part cette situation, leur étude structurale nécessite l'emploi de détergents qui risquent de modifier cette structure. Cependant, leur fonction de transport peut permettre de suivre les différentes étapes de leur purification. Ainsi, la perméase à lactose d'*E. coli* (LacY) a pu être purifiée sous une forme active (Viitanen et coll. 1986, Roepe et Kaback, 1989). Toutefois, la purification de LacY n'a jamais permis d'obtenir des cristaux qui auraient permis d'effectuer une analyse structurale complète par leur étude en diffraction aux rayons X.

Par contre, l'utilisation de la technique de fusion de gènes a été souvent employée, avec succès, pour déterminer la topographie de ce type de protéines. Bien que beaucoup moins résolutive que la diffraction aux rayons X, elle permet de connaître le nombre exact de segments transmembranaires ainsi que leurs positions. Cette technique, appliquée à la protéine LacY, a permis de confirmer qu'elle était constituée de 12 segments transmembranaires (Figure 8, page 38; Calamia et Manoil, 1990). Depuis, il a été montré que de nombreuses protéines ayant une fonction de transport pouvaient elles aussi posséder 12 segments transmembranaires, si bien que l'on parle aujourd'hui, de la famille des symports à 12 segments (Henderson, 1993).

La détermination précise de l'organisation membranaire de ces protéines est une étape importante dans la découverte du mécanisme moléculaire de la fonction de transport. C'est grâce à la connaissance de la topographie de LacY, que Ujwal et coll. (1994) ont pu mettre en évidence que le résidu d'acide glutamique N°269, situé à l'intérieur du 8ème segment transmembranaire, était impliqué à la fois dans le processus du transport et dans l'étape de reconnaissance du substrat. Ces résultats montrent donc, que non seulement la nature des acides aminés des segments transmembranaires détermine la stabilité même de ces segments, mais elle se révèle aussi très importante pour la fonction de ces protéines.

b) Les systèmes à plusieurs composants

Les protéines membranaires de cette catégorie sont des protéines qui possèdent plusieurs segments transmembranaires, ainsi que des régions extramembranaires de taille parfois très importante. Ces régions extramembranaires sont nécessaires à des interactions protéine-substrat ou protéine-protéine, interactions indispensables à la fonction de transport. Ainsi, le transport du maltose chez *E. coli*, nécessite pas moins de trois protéines membranaires, MalF, MalG et MalK. MalK est une protéine cytoplasmique, présentant un site affin pour l'ATP, située à la périphérie de la membrane grâce à des interactions avec MalF et MalG (Traxler et Beckwith, 1992). MalG est une protéine hydrophobe ancrée dans la membrane par 6 segments transmembranaires, conduisant à la localisation cytoplasmique des extrémités aminée et carboxylique (Dassa et Muir, 1993). Elle possède aussi 2 régions périplasmiques et 2 régions cytoplasmiques (Figure 8, page 38). Enfin, MalF est une protéine qui possède 8 segments transmembranaires, conduisant à la localisation cytoplasmique de ses deux extrémités, et à la localisation périplasmique d'une grande région centrale (Figure 8, page 38 ; Boyd et coll., 1987). Il semble que la région centrale soit impliquée dans la reconnaissance de la protéine périplasmique affine pour le maltose (MalE), et que les 8 segments transmembranaires soient nécessaires au transport du maltose à travers la membrane. Ces segments pourraient aussi entretenir des interactions avec MalG.

La protéine MalF représente donc un type de protéine membranaire ayant une fonction de transport, mais qui se révèle beaucoup plus complexe que celle jouée par la protéine LacY, alors que la structure de leurs substrats reste assez proche. De plus, étant l'une des premières protéines dont la topographie fût déterminée par la technique de fusion de gènes, elle est très souvent prise comme modèle pour l'étude des mécanismes d'insertion d'une protéine dans la membrane (Calamia et Manoil, 1992 ; Traxler et coll., 1992).

Comme autre exemple de protéine membranaire ayant une topographie particulière, on peut citer le cas de la protéine ExbB d'*E. coli*, impliquée notamment dans le transport des

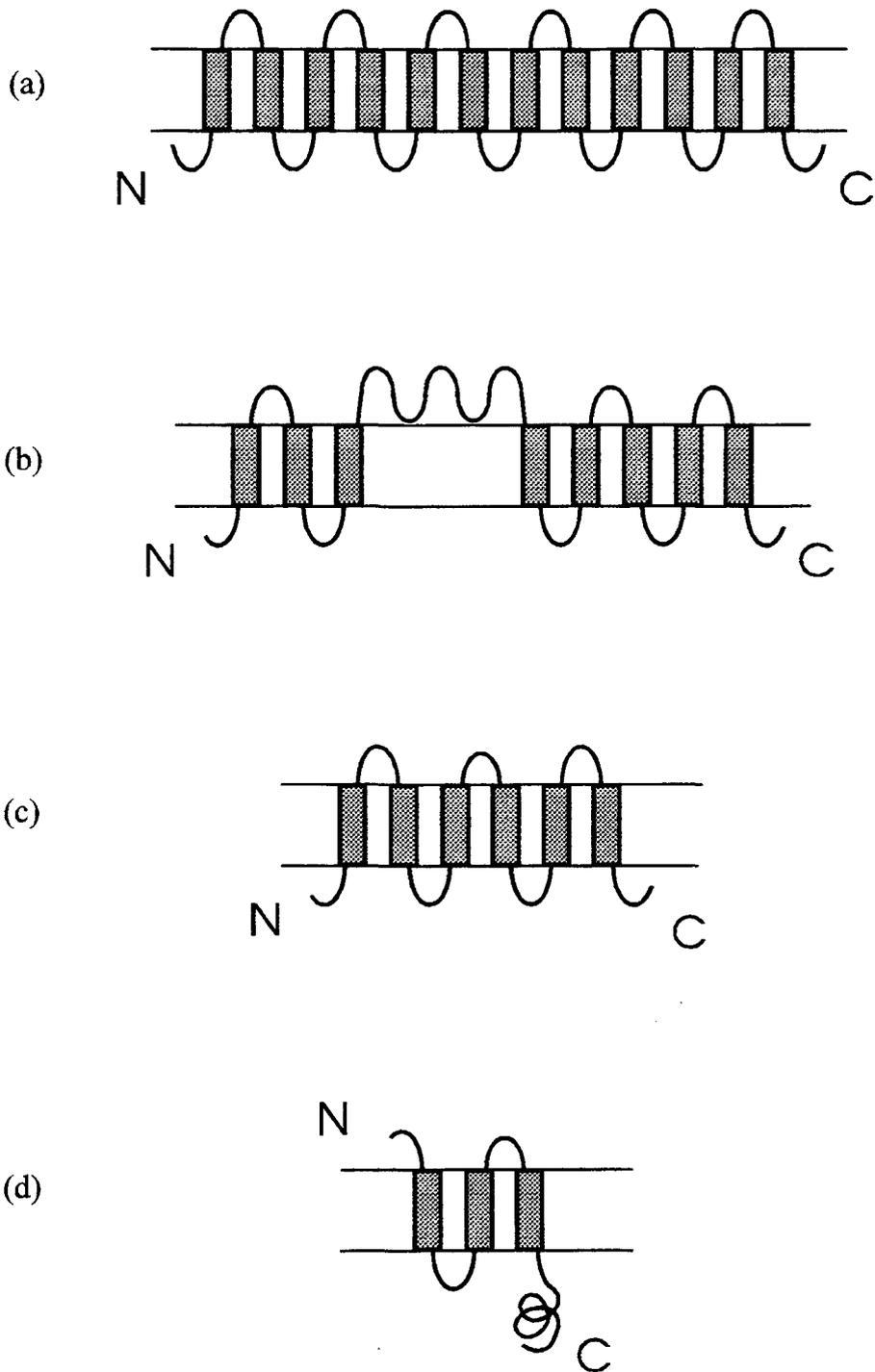


Figure 8 : Représentations schématiques des organisations membranaires :

- a : de la perméase à lactose d'*E. coli*
- b : de la protéine MalF d'*E. coli*
- c : de la protéine MalG d'*E. coli*
- d : de la protéine ExbB d'*E. coli*

macromolécules (voir page 15). Elle possède trois segments transmembranaires aboutissant à la localisation périplasmique de son extrémité aminée, et à la localisation cytoplasmique de son extrémité carboxylique (Figure 8 ; Kampfenkel et Braun, 1993).

4°) LES PROTEINES N'AYANT PAS UNE FONCTION DE TRANSPORT

Dans ce groupe de protéines membranaires, on trouve notamment des protéines qui sont en relation avec le métabolisme des phospholipides. Parmi celles-ci, la diacylglycérol kinase d'*E. coli*, est ancrée dans la membrane cytoplasmique par 3 segments transmembranaires. Ces segments provoquent la localisation cytoplasmique de l'extrémité aminée, et la localisation périplasmique de l'extrémité carboxylique (Figure 9, page 40 ; Smith et coll., 1994).

B) LES PROTEINES AYANT UN SEUL SEGMENT TRANSMEMBRANAIRE

1°) LA PARTIE AMINEE EST A L'INTERIEUR DU CYTOPLASME

Les protéines TonB et ExbD d'*E. coli* sont impliquées dans le transport de macromolécules et participent au maintien de l'intégrité de l'enveloppe.

La protéine TonB est ancrée dans la membrane cytoplasmique par son extrémité aminée dont la séquence est considérée comme une séquence signal permettant normalement l'exportation des protéines (Figure 9, page 40 ; Postle et Skare, 1988). Dans ce cas particulier, on parle d'ancrage dans la membrane par une séquence signal non clivée. Ce type d'ancrage a aussi été constaté lors de l'étude d'une hydrolase d'UDP-sucre de *Salmonella enterica* (Jones et coll., 1993). Dans ces deux cas, le reste de la protéine est située dans le périplasme.

La protéine ExbD présente elle aussi une orientation similaire à celle de la protéine TonB. Mais dans ce cas, le maintien de ExbD dans la membrane est assuré par un segment transmembranaire et non une séquence signal (Figure 9, page 40 ; Kampfenkel et Braun, 1992).

2°) LA PARTIE AMINEE EST A L'EXTERIEUR DU CYTOPLASME

La préprotéine gpVIII des phages filamenteux est insérée dans la membrane cytoplasmique d'*E. coli* par un segment situé à son extrémité carboxylique. La quasi totalité de la protéine est quant à elle périplasmique (Figure 9, page 40).

A l'inverse, le cytochrome P-450 est inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique par son extrémité aminée, qui est orientée sur la face externe de la membrane. Le reste de la protéine est quant à lui entièrement cytoplasmique (Figure 10, page 42). Ce cas de figure n'a jamais encore été mis en évidence chez les bactéries.

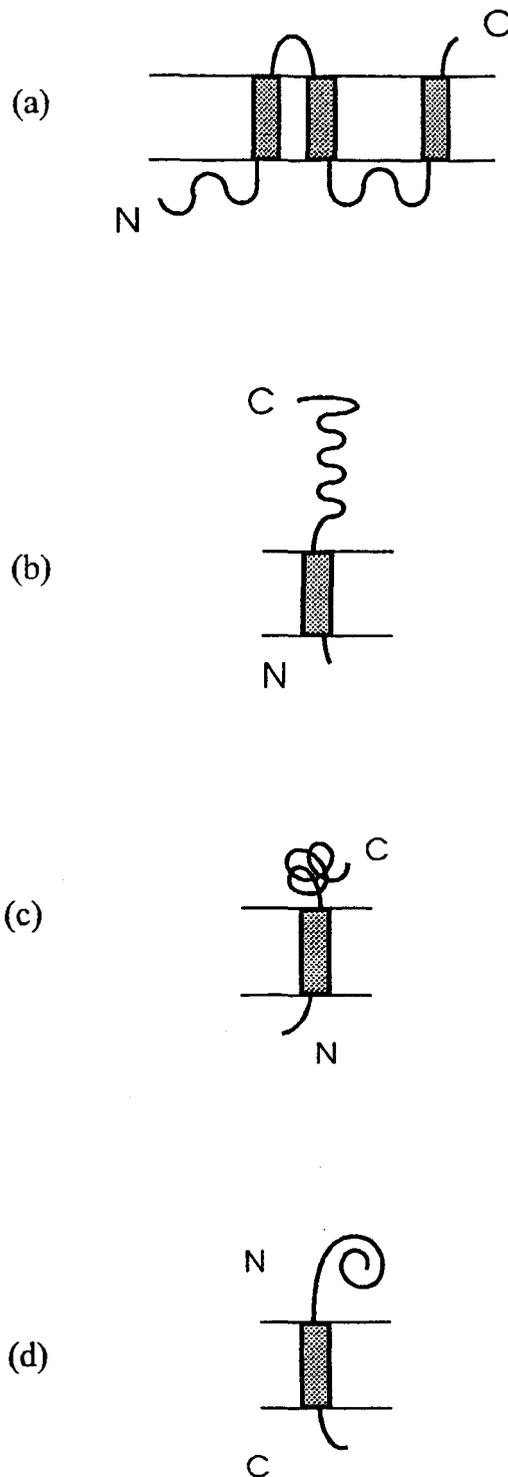


Figure 9 : Représentations schématiques des organisations membranaires :
 a : de la diacylglycérine kinase d'*E. coli*
 b : de la protéine TonB d'*E. coli*
 c : de la protéine ExbD d'*E. coli*
 d : de la préprotéine gpVIII des phages filamenteux

C) LES PROTEINES LIEES COVALAMMENT AUX LIPIDES

1°) LES LIOPROTEINES BACTERIENNES

Il s'agit de protéines exportées dans le périplasme grâce à une séquence signal particulière. Cette séquence est clivée, libérant un résidu de cystéine, dont la fonction aminé est substituée par un résidu monoacyle, et la fonction thiol par un résidu de diacylglycérol (Figure 10, page42). Ces modifications s'effectuent à la surface périplasmique de la membrane cytoplasmique, car la protéine qui clive la séquence signal est membranaire (et son site actif localisé dans le périplasme), ainsi que les acides gras substituants le résidu de cystéine. Ce mécanisme, déduit des observations effectuées sur la lipoprotéine majeure d'*E. coli* (la lipoprotéine de Braun), prévaut pour la plupart des autres lipoprotéines (A. Pugsley, 1993).

2°) LES PROTEINES EUCARYOTES ANCREES PAR DES ACIDES GRAS

Une grande partie des protéines eucaryotes situées à la surface cellulaire sont ancrées dans la membrane par des phosphatidylinositols. La liaison avec ces phospholipides est située à l'extrémité carboxylique de la protéine, ce qui permet l'orientation de la totalité de la protéine vers le milieu extérieur (Tartakoff et Singh, 1992).

A côté des protéines ancrées par les phosphatidylinositols, il existe deux autres types d'ancrage : la myristoylation sur des résidus de glycines à l'extrémité aminée, et la palmitoylation au niveau des résidus internes de sérine, thréonine et cystéine.

D) LES PROTEINES AFFINES POUR LES MEMBRANES

Le premier cas pris comme exemple est celui de la protéine MalK impliquée dans le transport du maltose chez *E. coli*. La séquence en acides aminés de cette protéine ne présente aucune caractéristique lui permettant de s'insérer dans la membrane cytoplasmique. Cependant, lors de sa purification, elle est retrouvée dans la fraction membranaire. Cette protéine ne possède pas non plus de lien covalent avec des lipides. Sa localisation membranaire ne peut donc s'expliquer que par l'existence d'interactions avec les autres protéines membranaires du système de transport, et notamment MalG (M. Schwartz, 1987). Ces interactions sont absolument requises pour la fonctionnalité de ce transport (Davidson et Nikaido, 1991). En effet, MalK possède un site affin pour l'ATP dont l'hydrolyse est nécessaire au transport du maltose (Panagiotidis et coll., 1993).

Le deuxième cas concerne la protéine SecA d'*E. coli* qui est impliquée dans la voie générale de sécrétion des protéines. Il s'agit d'une protéine dont la séquence en acides aminés ne révèle pas de segment transmembranaire potentiel. Cette protéine est cependant retrouvée dans des extraits membranaires, et cette localisation est certainement due à la protéine membranaire SecY

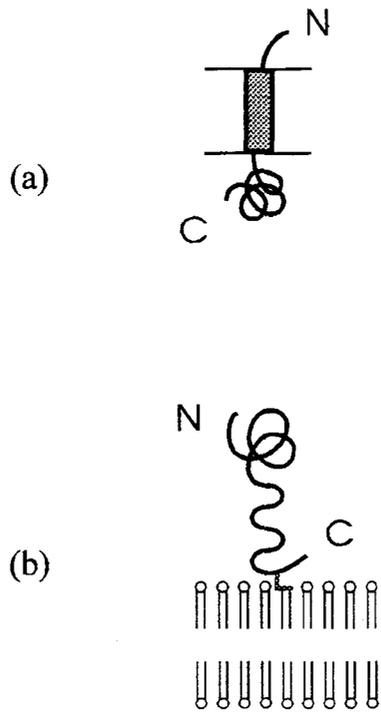


Figure 10 : Représentations schématiques:
 a : de l'organisation membranaire du cytochrome P450
 b : d'une lipoprotéine d'*E. coli*

(Lill et coll., 1990). De plus, il a été montré que la protéine SecE entretient des interactions avec SecY afin de permettre un bon fonctionnement de la machinerie de sécrétion (Brundage et coll., 1990).

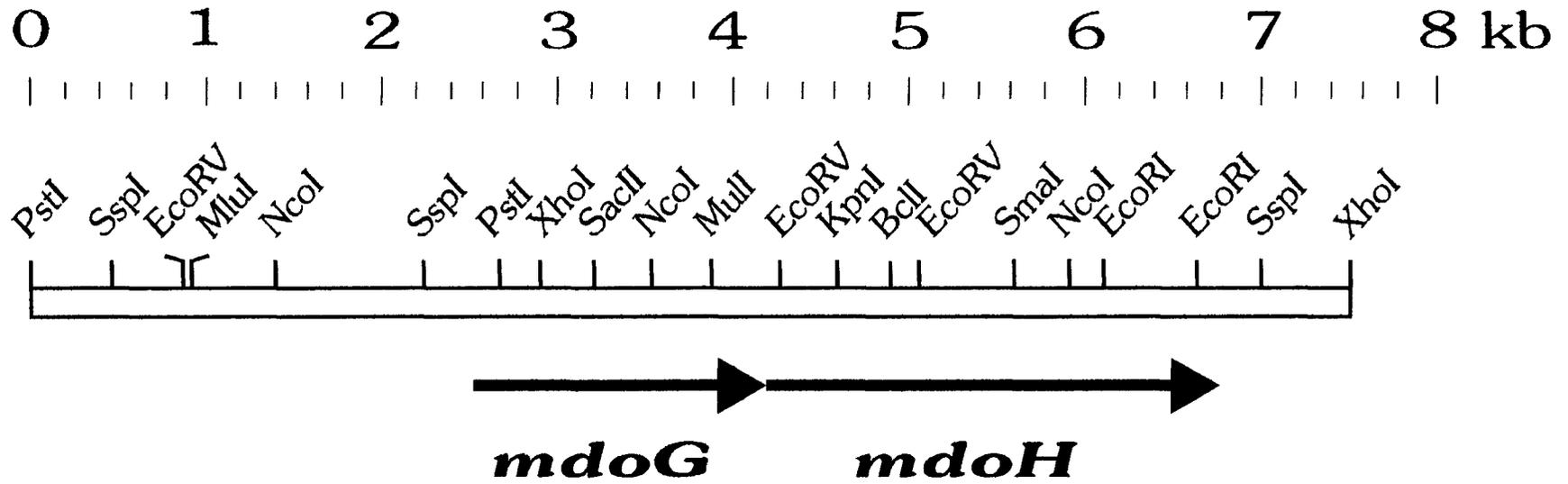


Figure 11 : Carte des principaux sites de restriction couramment utilisés dans les différents sous-clonages du locus *mdoGH*.

2 - RESULTATS

I : ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE *mdoH*

A) EXPRESSION DU GENE *mdoH* A PARTIR D'UN VECTEUR D'EXPRESSION

1°) LE GENE *mdoH* PEUT PERMETTRE UNE AMPLIFICATION DE LA QUANTITE DE MDO

Afin d'étudier spécifiquement le gène *mdoH* et le produit de son expression, nous avons décidé de l'exprimer indépendamment du gène *mdoG* et du promoteur naturel de l'opéron. Nous avons choisi de sous-cloner *mdoH* dans le vecteur d'expression pYZ4 contenant le promoteur *placUV5*, inductible par l'IPTG. Le fragment *HindIII-SspI* du plasmide pNF216 (Lacroix et coll., 1989) correspondant au fragment *MluI-SspI* (de coordonnées 3,9-7 kb, sur la Figure 11) a été introduit dans le vecteur pUC8 au site *SmaI*, après que ses extrémités aient été rendues franches par le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I d'*E. coli*. Le plasmide obtenu, pNF308, possède la région codante de *mdoH* retournée par rapport au promoteur *plac*. La région codante de *mdoH* est alors bornée par deux sites *BamHI*, ce qui m'a permis de l'insérer au site *BamHI* du vecteur pYZ4. L'orientation permettant d'obtenir la région codante de *mdoH* sous le contrôle du promoteur *placUV5* a été conservée, le plasmide ainsi construit se nomme pNF309 (Figure 12, page 46). Ce plasmide, placé dans une souche *mdoH200::Tn10*, permet non seulement la restauration de la biosynthèse du MDO, mais aussi l'obtention d'une quantité de MDO d'environ 1,5 fois supérieure à la quantité obtenue dans une souche sauvage, aussi bien à haute qu'à basse osmolarité (Figure 13, page 46). Il est intéressant de noter que quelque soit la quantité d'IPTG ajoutée on obtient cette légère amplification. De même, le plasmide pNF309 placé dans une souche sauvage (JM83) provoque la même augmentation. Il semble donc que le niveau de base de l'expression par le promoteur *placUV5*, non induit, soit suffisant pour obtenir une quantité de MDO supérieure à la quantité présente dans une souche sauvage.

2°) DETERMINATION DE LA TAILLE DU PRODUIT DU GENE *mdoH*

Lors du séquençage nucléotidique du locus *mdoGH*, il n'a pas été possible de déterminer précisément le début du cadre de lecture du gène *mdoH*. L'initiation de celui-ci est possible à trois endroits différents (Loubens et coll., 1993). Le premier codon d'initiation possible est un ATG situé 3 bases en amont du codon stop du gène *mdoG*. La séquence chevauchante est la suivante : ATGAATAA. Ce cas de figure est fréquent pour deux phases ouvertes de lecture appartenant à la même unité de transcription (Mac Carthy et Gualerzi, 1990). Le deuxième ATG est situé 30

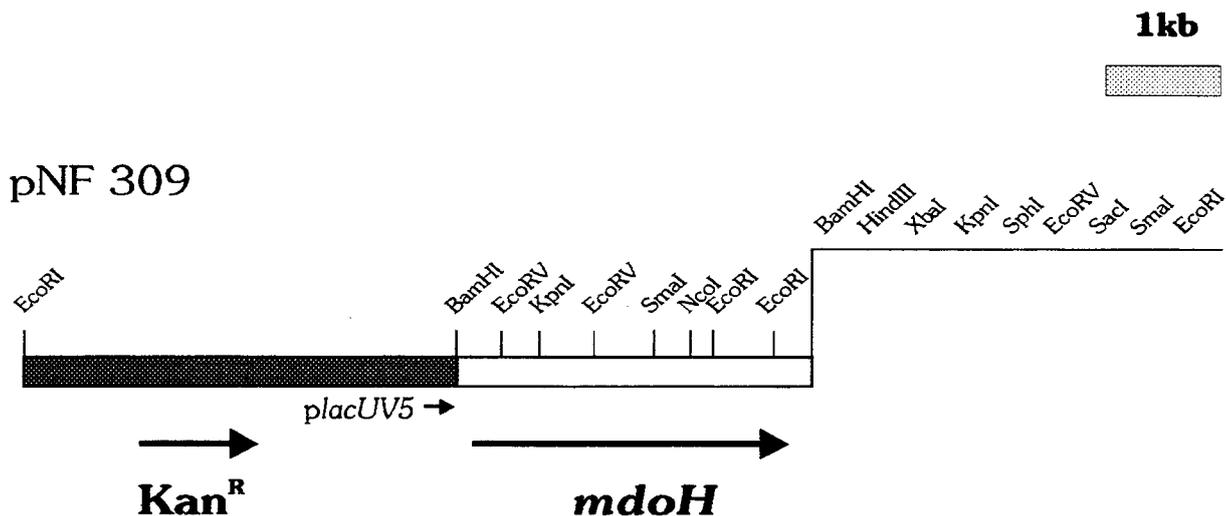


Figure 12 : Carte du plasmide permettant l'expression du gène *mdoH* à partir du promoteur *placUV5*. Le rectangle gris représente le vecteur pYZ4.

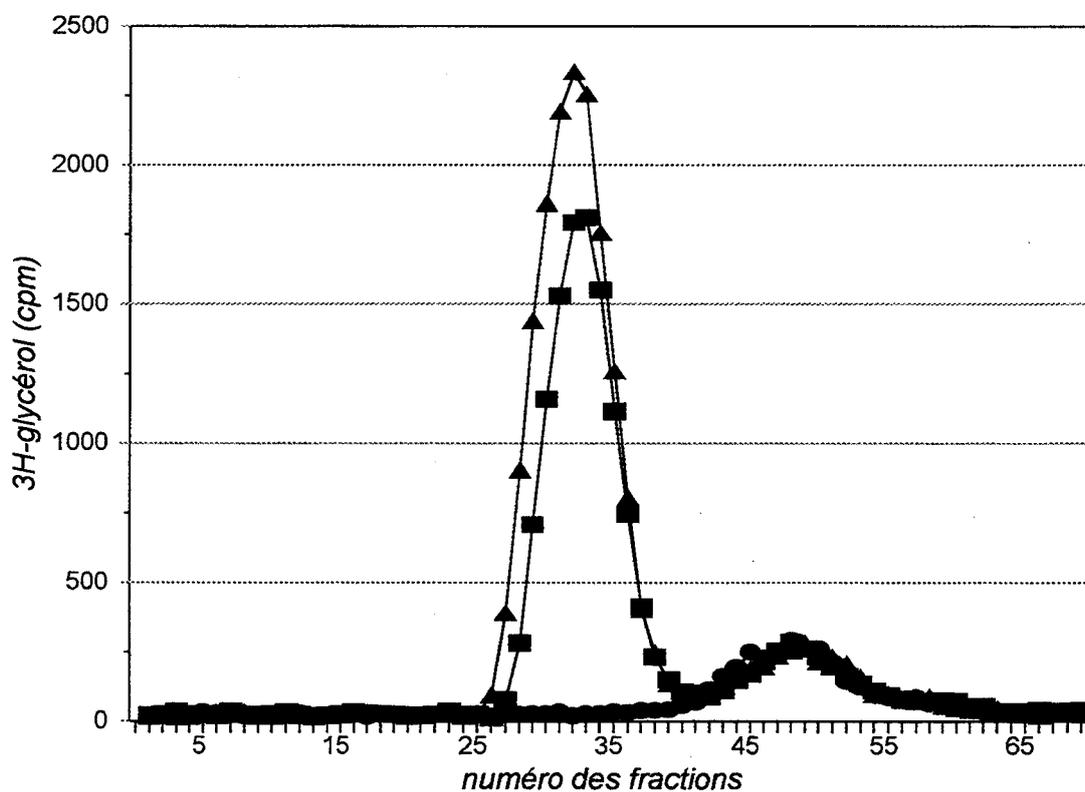


Figure 13 : Chromatographie sur Sephadex G25 des extraits pyridine des souches :

- : pYZ4 / NFB216
 - : pYZ4 / JM83
 - ▲ : pNF309 / NFB216
- cultivées en LOS (70 mosM).

nucléotides en aval du premier et possède un site putatif de liaison au ribosome (TGAGTA), contrairement au premier ATG qui n'en possède pas. Enfin le troisième codon d'initiation possible, situé 60 nucléotides en aval du premier ATG, serait un TTG (1% des événements de traduction chez *E. coli* ; Mac Carthy et Gualerzi, 1990), précédé par une séquence de liaison au ribosome (GCGAGA) proche du consensus (AGGAGG). En résumé, l'initiation de la traduction à partir du premier ATG conduirait à la formation d'une protéine de 847 acides aminés, à partir du deuxième ATG on obtiendrait une protéine de 837 acides aminés, et à partir du TTG la taille de la protéine serait de 827 acides aminés.

a) Détermination du codon d'initiation de *mdoH*

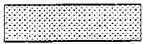
Afin de connaître la taille précise du polypeptide codé par le gène *mdoH* et d'en déduire ainsi la position du codon d'initiation de la traduction, j'ai placé le fragment *Bam*HI de pNF309 au site *Bam*HI du vecteur pT7-6 (Tabor et Richardson, 1985) afin de placer *mdoH* sous le contrôle du promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7 (le plasmide résultant est pNF441, voir Figure 14, page 48). Puis, j'ai effectué une délétion interne en utilisant les sites *Eco*RV (le plasmide résultant est pNF450), ainsi que deux délétions de la partie 3'. La première est une délétion par l'enzyme de restriction *Sma*I (le plasmide résultant est pNF458), et la deuxième par les enzymes de restriction *Kpn*I (les extrémités libérées ont été rendues franches par le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I) et *Sma*I (le plasmide résultant est pNF468). Le marquage de ces différents polypeptides avec de la méthionine ³⁵S (voir fiche technique N°8), devaient nous permettre d'effectuer une mesure précise de la masse de MdoH, et ainsi de déterminer lequel des trois codons d'initiation était utilisé. En effet, le plasmide pT7-6, placé dans la souche PAP1568 permet de marquer spécifiquement avec de la méthionine ³⁵S les protéines exprimées grâce au promoteur du plasmide pT7-6.

Le résultat obtenu pour le fragment exprimé à partir de pNF468 montre une masse proche de celle calculée en partant du premier ATG (Figure 15, page 49). En aucun cas, elle ne correspond à une taille inférieure. Ceci nous permet donc de conclure que l'initiation de la traduction du gène *mdoH* débute bien à partir du premier ATG chevauchant la fin du cadre de lecture de *mdoG*, et qu'ainsi la protéine MdoH est bien constituée de 847 acides aminés.

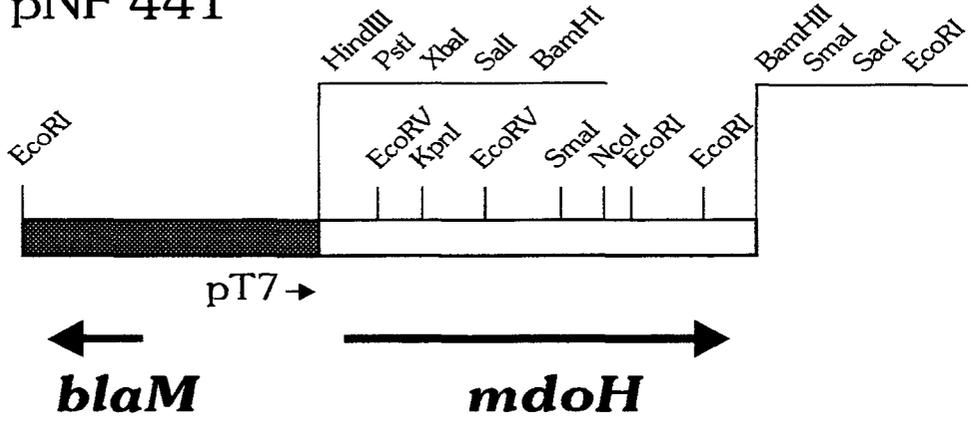
b) La protéine MdoH migre anormalement.

La taille des polypeptides radiomarqués à partir des plasmides pNF441, pNF450 et pNF458 semblent donner des résultats contradictoires avec le choix du premier ATG. En effet les tailles observées sont nettement inférieures à celles attendues, mais même en calculant les tailles à partir du troisième codon d'initiation possible, les tailles observées restent très inférieures aux tailles calculées.

1kb



pNF 441



pNF 461

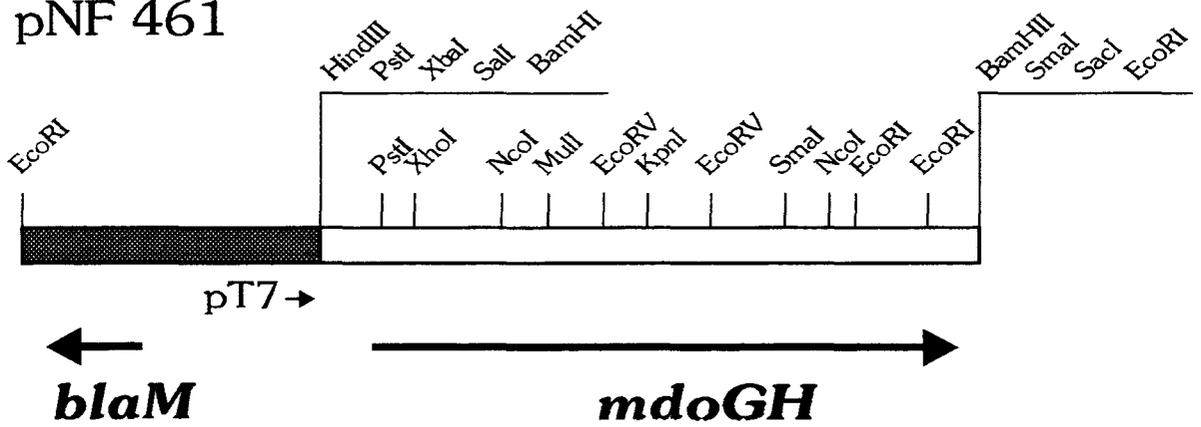
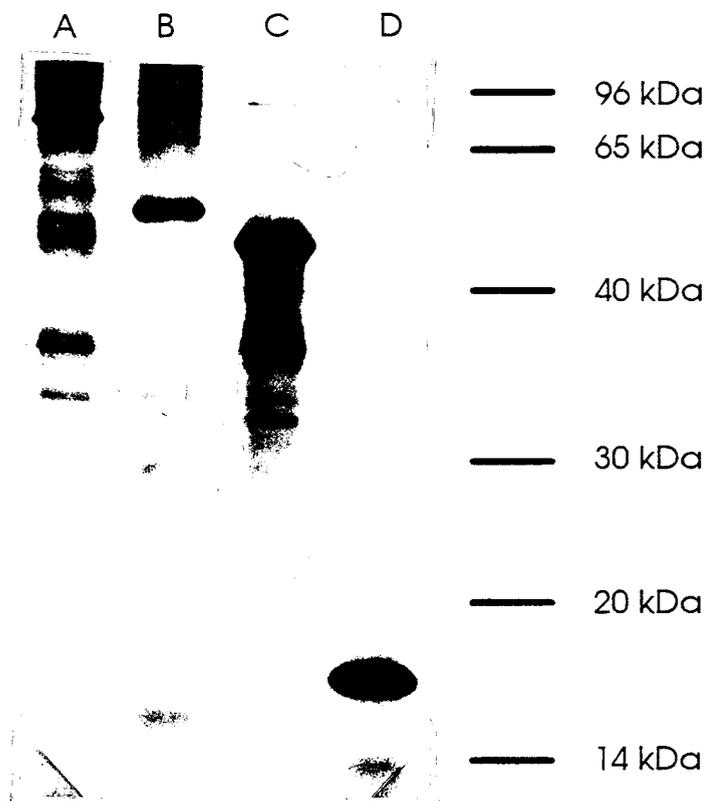


Figure 14 : Cartes de plasmides utilisés pour le marquage radioactif des protéines MdoG et MdoH.

	extrait de la composition en acides aminés		
	nombre total de méthionine / cystéine	nombre total de leucine / alanine / arginine	nombre total d'acides aminés*
pNF468	5 / 1	9 / 15 / 14	145
pNF458	18 / 8	47 / 44 / 36	487
pNF450	19 / 8	76 / 36 / 44	582
pNF441	28 / 10	106 / 72 / 64	847

* : calcul effectué à partir du premier ATG



	masses des polypeptides	
	masses prédites	masses apparentes
pNF468	16,3 kDa	17,3 kDa
pNF458	55,3 kDa	47,5 kDa
pNF450	66,5 kDa	55 kDa
pNF441	96,9 kDa	80 kDa

pNF468 : délétion *KpnI-SmaI* de pNF441
 pNF450 : délétion *EcoRV* de pNF441

pNF458 : délétion *SmaI* de pNF441
 pNF441 : *mdoH* dans pT7-6 (voir figure &)

Figure 15 : Autoradiographie des protéines marquées par les plasmides :

piste A : pNF441 (*mdoH*) piste B : pNF450 (*mdoHΔEcoRV*),
 piste C : pNF458 (*mdoH ΔSmaI*) piste D : pNF468 (*mdoH* tronqué au site *KpnI*).

Tableau II : Composition en acides aminés de la protéine MdoH

valeur d'hydrophobie*	liste des acides aminés		nombre de chaque acide aminé	pourcentage en nombre
4,5	Ile	I	36	4,25
4,2	Val	V	59	6,97
3,8	Leu	L	106	12,51
2,8	Phe	F	42	4,96
2,5	Cys	C	10	1,18
1,9	Met	M	28	3,31
1,8	Ala	A	72	8,50
-0,4	Gly	G	49	5,79
-0,7	Thr	T	38	4,49
-0,8	Ser	S	54	6,38
-0,9	Trp	W	32	3,78
-1,3	Tyr	Y	24	2,83
-1,6	Pro	P	45	5,31
-3,2	His	H	19	2,24
-3,5	Asp	D	43	5,08
-3,5	Asn	N	23	2,72
-3,5	Glu	E	42	4,96
-3,5	Gln	Q	31	3,66
-3,9	Lys	K	30	3,54
-4,5	Arg	R	64	7,56
		total :	847	

Masse moléculaire moyenne : 96939,32

* : d'après Kyte et Doolittle (1982)

Il est donc possible que la composition en acides aminés de ces polypeptides influence beaucoup leur migration dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Cette composition révèle un très fort pourcentage de résidus hydrophobes, l'alanine et la leucine étant les résidus les plus importants en nombre (voir Tableau II). Des migrations anormales de même nature ont été décrites pour d'autres protéines membranaires telles que MalF et LacY (Schuman et coll., 1980, Buechel et coll., 1980). Il est donc probable que MdoH appartienne à ce type de protéine membranaire.

Le premier ATG de *mdoH* chevauche donc le dernier codon de *mdoG*. En amont de cet ATG, il n'y a pas de séquence typique de Shine et Dalgarno. Ceci nous a conduit à penser que la traduction de *mdoH* était couplée à celle de *mdoG*, c'est à dire que le complexe de traduction pourrait « déraiper » au niveau du codon stop de *mdoG* afin de démarrer la traduction de *mdoH*.

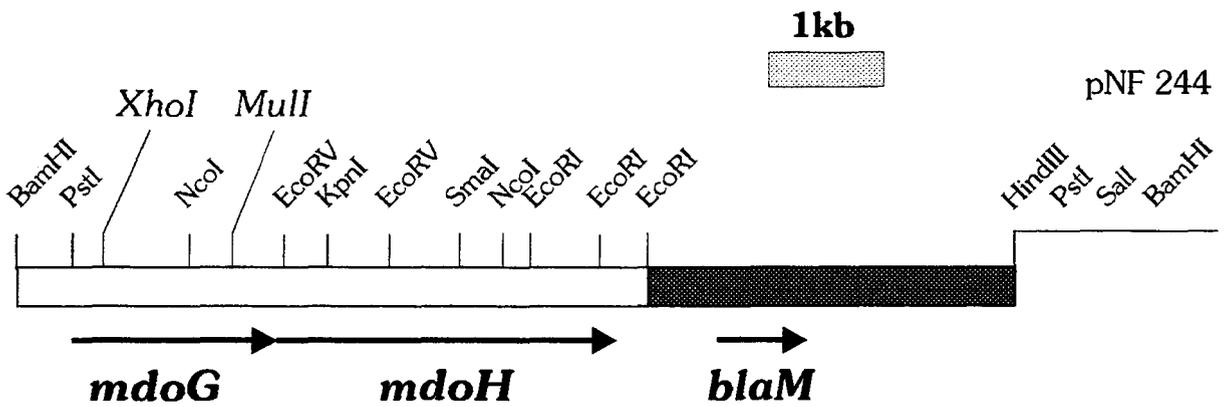
B) EXPRESSION DU GENE *mdoH* A L'INTERIEUR DE L'OPERON *mdoGH*

1°) RECHERCHE D'UN COUPLAGE TRADUCTIONNEL ENTRE *mdoG* ET *mdoH*

Dans le but de préciser le couplage traductionnel liant *mdoH* à *mdoG*, j'ai réalisé dans le plasmide pNF244 (fragment *SspI-SspI* de coordonnées 2,2-7 kb sur la Figure 11 au site *SmaI* de pUC8, Lacroix et coll., 1989), au niveau de la séquence codante correspondante à *mdoG*, une rupture du cadre de lecture en deux endroits différents. Au site unique *XhoI* j'ai linéarisé le plasmide puis, en utilisant le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I, j'ai rendu les extrémités franches puis ligaturé ce plasmide. Ainsi modifié, le site *XhoI* n'existe plus et cette modification de la séquence en nucléotides provoque l'apparition d'un codon stop 17 codons après le site *XhoI* (Figure 16, page 52). La séquence en acides aminés déduite révèle une protéine MdoG mature de seulement 75 résidus dont les 17 derniers sont modifiés par rapport à la séquence sauvage. Suivant le même principe, le site *MluI* a été « bouché », ceci provoquant une délétion de la partie carboxylique de MdoG de 89 acides aminés et une modification des 16 derniers acides aminés (Figure 16, page 52). Ces nouveaux plasmides ont été placés dans différents contextes afin de déterminer leurs effets sur la biosynthèse du MDO (Tableau III, page 53). Les résultats présentés font apparaître qu'il n'existe pas de couplage traductionnel fort entre *mdoG* et *mdoH*, puisque l'on obtient toujours une complémentation de la mutation *mdoH200::Tn10* par les plasmides pNF423 et pNF424. La traduction de *mdoH* semble donc pouvoir démarrer sans que la protéine MdoG soit normalement traduite.

2°) IDENTIFICATION DE LA MUTATION *mdoG215*

Contre toute attente, la mutation due à la modification du site *MluI* conduit à une activité partielle de MdoG. J'ai ainsi obtenu une nouvelle mutation, appelée *mdoG215*, qui permet d'obtenir



pNF 244

XhoI

pNF 244

....AAACTCGAGTTCTACCATCAGGGTATGTACTTCGATACCCCGGTCAAATAAAATGAA....
TTTGAGCTCAAGATGGTAGTCCCTTACATGAAGCTATGGGGCCAGTTTTATTACTT....
K L E F Y H Q G M Y F D T P V K I N E

....AAAC**CTCGATCGAG**TTCTACCATCAGGGTATGTACTTCGATACCCCGGTCAAATAAAAT**TGA**
TTT**GAGCTAGCTC**AAGATGGTAGTCCCTTACATGAAGCTATGGGGCCAGTTTTATTACT
K L D R V L P S G Y V L R Y P G Q N K

(75 AA = 8,7 kDa)

pNF 423

MluI

pNF 244

....CAAACGCGTCGTTCAACGGGGGATGTGAAGCAGTCGAACCTGATTCCGCCAGCCTGAC....
GTTTGCAGCAAGTTGCCCCCTACACTTCGTCAGCTTGGACTAAGCGGTCCGACTG....
Q T R R S T G D V K Q S N L I R Q P D

....CAA**ACGCGCGCGT**CGTTCAACGGGGGATGTGAAGCAGTCGAACCTGATTCCGCCAGCCT**TGA**
GTT**TGCGCGCGCA**GCAAGTTGCCCCCTACACTTCGTCAGCTTGGACTAAGCGGTCCGACT
Q T R A S F N G G C E A V E P D S P A

(400 AA = 45,3 kDa)

pNF 424

Figure 16 : comparaison entre la séquence en nucléotides de *mdoG* et les séquences modifiées au niveau des sites *XhoI* et *MluI*. Les séquences en acides aminés déduites sont indiquées ainsi que la taille attendue des polypeptides démunis de leur séquence signal (taille de la protéine MdoG mature : 489 AA = 55,4 kDa).

plasmides	souches réceptrices		
	JM83 (G^+H^+)	NFB702 (G^-H^+)	NFB216 (G^+H^-)
pUC8	5000 ± 500	1000 ± 100	800 ± 100
pNF244	15000 ± 1000	14000 ± 1000	15000 ± 1000
pNF423	8500 ± 1000	1000 ± 100	7000 ± 1000
pNF424	9500 ± 1000	3500 ± 500	8000 ± 1000

Tableau III : Radioactivité des extraits pyridine contenant le MDO après un marquage effectué en milieu LOS par du ^3H -glycérol (voir fiche technique N°5).

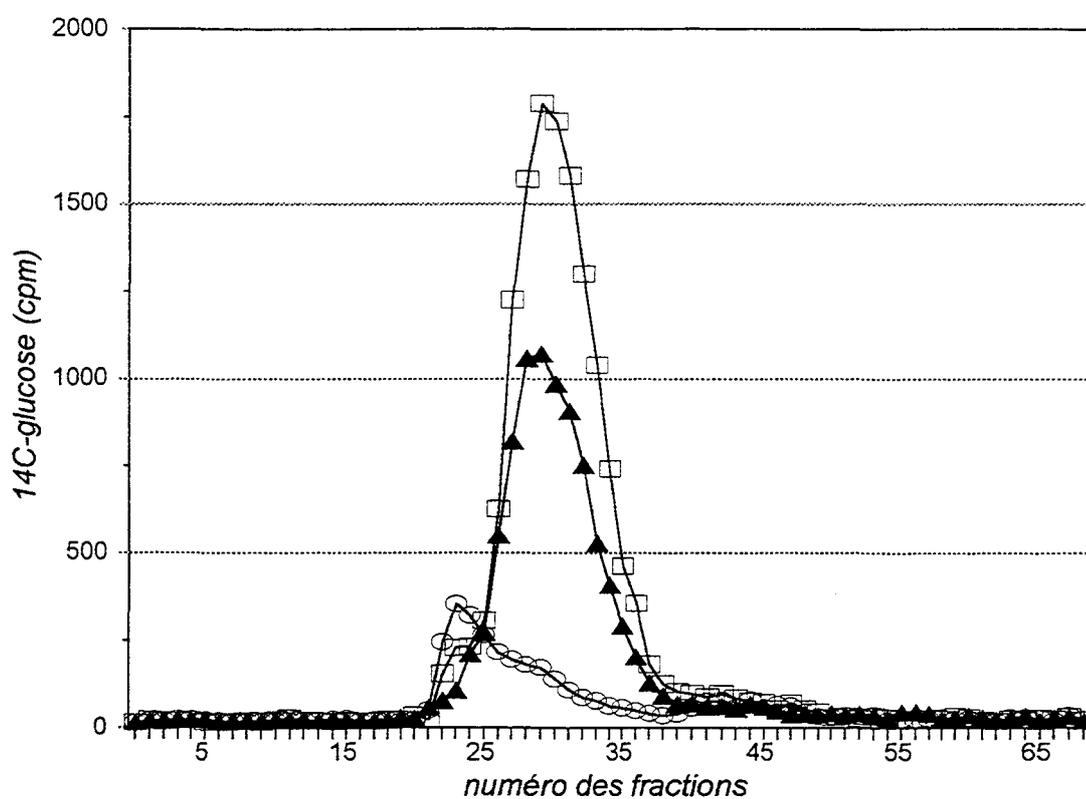
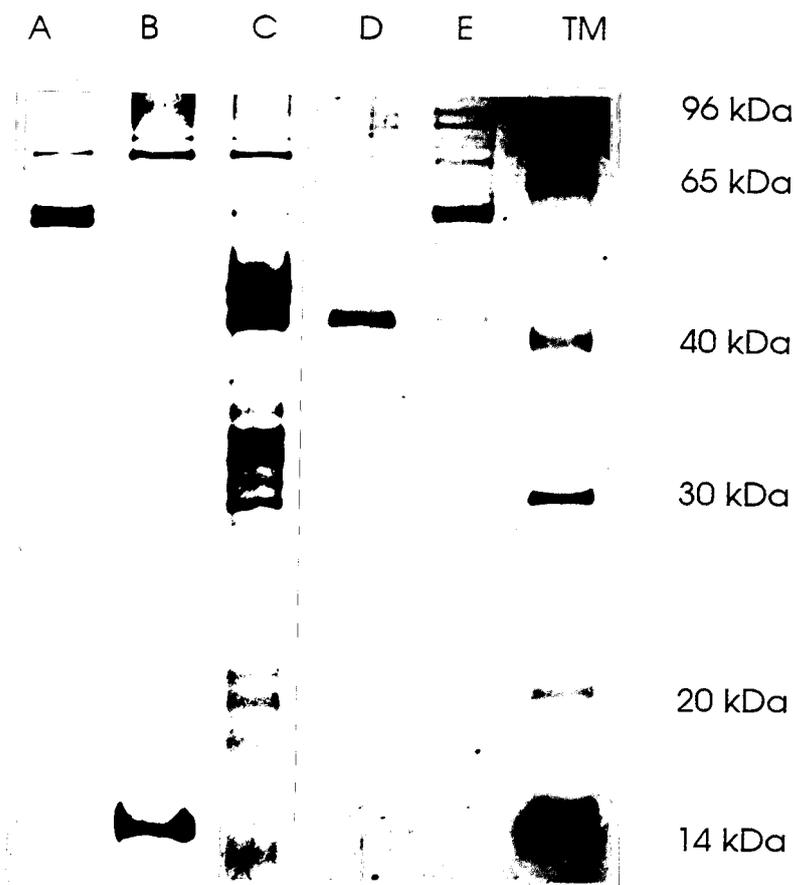


Figure 17 : Chromatographie sur Sephadex G25 des extraits pyridine des souches :

- ⊖ : NFB724
 - ⊞ : DF214
 - ▲ : pNF424 / NFB724
- cultivées en LOS (70 mosM).



part du gène <i>mdoG</i> des plasmides :	extrait de la composition en acides aminés de la protéine MdoG mature		masses des polypeptides	
	nombre total de méthionine / cystéine	nombre total d'acides aminés	masses prédites	masses apparentes
pNF459	1 / 0	75	8,7 kDa	11,3 kDa
pNF460	7 / 1	400	45,3 kDa	46,2 kDa
pNF461	10 / 0	489	55,4 kDa	56,3 kDa

pNF459 : pNF461 modifié au niveau du site *XhoI*
 pNF460 : pNF461 modifié au niveau du site *MluI*
 pNF461 : opéron *mdoGH* dans pT7-6 (voir figure &, page &)

Figure 18 : Autoradiographie des protéines marquées par les plasmides pNF461 (piste A), pNF459 (piste B), pNF460 (piste C), juxtaposées aux protéines des extraits périplasmiques révélées au bleu de Coomassie (piste D : surexpression de l'allèle *mdoG215* ; piste E : surexpression de l'allèle *mdoG+*). MdoG* correspond à la protéine MdoG encore munie de sa séquence signal.

une quantité de MDO de 0,7 fois inférieure à la quantité sauvage (JM83) et 4 fois inférieure à la quantité obtenue lorsque *mdoG* est exprimé à partir d'un plasmide à copies multiples (pNF244 / NFB702, Tableau III, page 53). Le plasmide pNF424 a alors été placé dans la souche NFB724 (DF214, *mdoG202::neo*) dans le but de déterminer si la baisse du niveau de marquage en glycérol correspond à une baisse de la quantité de MDO, ou à une baisse du taux de substitution. Le résultat de ce dosage confirme que la mutation *mdoG215* affecte uniquement la quantité de MDO synthétisée (Figure 17, page 53).

Afin de vérifier la taille et la nature de la protéine codée par l'allèle *mdoG215*, nous avons réalisé deux expériences complémentaires. Tout d'abord j'ai sous-cloné le fragment contenant la totalité du gène *mdoG* (y compris le promoteur) dans le plasmide pNF441 (Figure 14, page 48) contenant déjà la partie codante du gène *mdoH*. Ainsi j'ai reconstitué l'opéron *mdoGH* en entier dans le vecteur pT7-6 (le plasmide résultant est pNF461, Figure 14, page 48 ; ce plasmide contient le même fragment que celui qui est sous-cloné dans pNF244). J'ai effectué les mêmes sous-clonages avec les gènes *mdoG* modifiés au niveau des sites *XhoI* et *MluI* (les plasmides résultants sont respectivement pNF459 et pNF460).

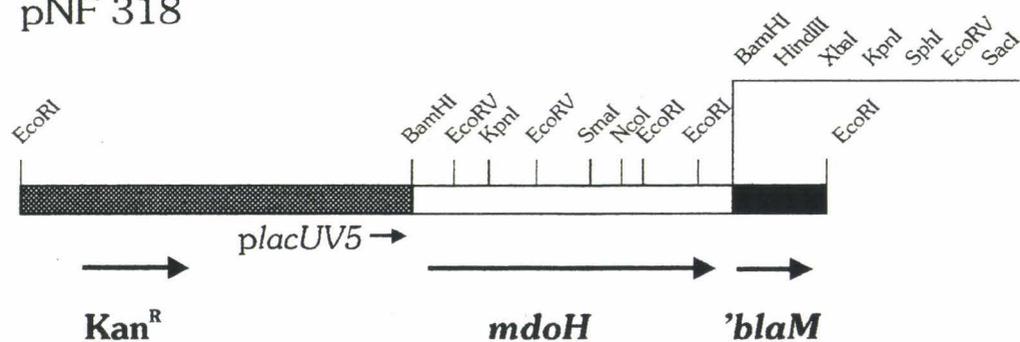
Le résultat des marquages effectués (Figure 18) montrent que dans le cas de l'opéron *mdoGH* sauvage, il existe 3 bandes dont l'une correspond à la protéine MdoH et les deux autres à la préprotéine MdoG et à sa forme mature. Dans le cas du plasmide ayant perdu le site *XhoI* on voit toujours la bande correspondant à MdoH et une petite bande, d'une taille de 9 à 10 kDa, correspondant à MdoG tronquée encore munie de sa séquence signal. Dans le cas du plasmide ayant perdu le site *MluI* on observe toujours la bande correspondante à MdoH et 3 bandes majeures dont les tailles sont estimées à environ 48, 45 et 43 kDa. Il semblerait que la bande à 48 kDa corresponde à la protéine MdoG tronquée encore munie de sa séquence signal, la bande à 45 kDa serait la forme mature de la préprotéine précédente, et cette forme étant instable, elle serait digérée en un produit plus stable qui correspondrait à la bande de 43 kDa. Cette protéolyse pourrait être réalisée par des enzymes périplasmiques chargées d'« éliminer » des séquences peptidiques anormales (Ichihara et coll., 1993). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé l'extraction des protéines du périplasme à partir d'une souche transformée par un plasmide permettant la surexpression de l'allèle *mdoG215*. Le résultat obtenu montre l'accumulation d'une seule protéine qui migre au même niveau (43 kDa) que celle révélée par l'autoradiographie. Ceci confirme donc que la forme de la protéine MdoG tronquée accumulée, a une taille plus courte que la taille prédite (45,3 kDa).

Ces expériences de marquage des protéines MdoG et MdoH font apparaître une nette différence entre l'intensité des bandes concernant MdoG et MdoH. En effet, l'intensité de la bande

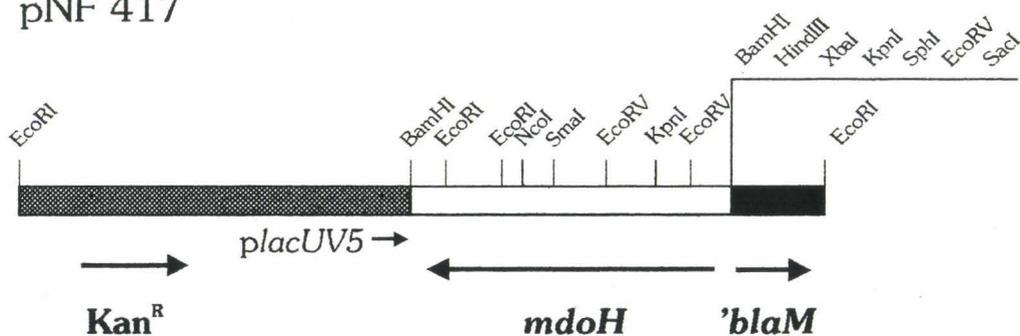
1kb



pNF 318



pNF 417



pNF 428

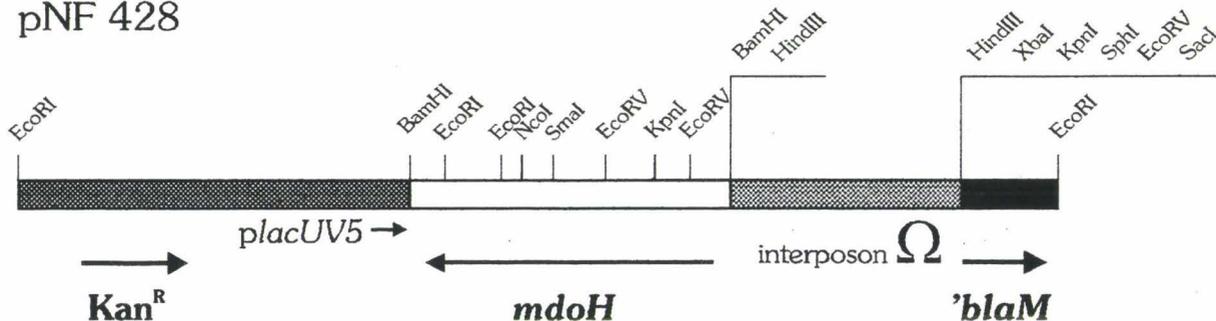


Figure 19 : Cartes des différents plasmides ayant permis la mise en évidence d'un promoteur situé à la fin de la région codante de *mdoG*.

correspondant à MdoH est très inférieure à celle correspondant à MdoG, bien que MdoH possède 38 résidus soufrés contre 10 pour MdoG. On remarquera aussi sur la figure 15, page 49, que les intensités correspondant aux formes tronquées de MdoH sont plus fortes que celle correspondant à la protéine MdoH sauvage, alors que le nombre de leurs résidus soufrés est plus faible. Il semble donc que la faiblesse de ce marquage soit en rapport avec une limitation de la quantité de protéine MdoH synthétisée, et non en rapport avec une limitation du niveau d'expression du gène *mdoH*. D'autre part, lors de travaux antérieurs, il n'a jamais été possible de révéler les protéines MdoG et MdoH à partir d'un gel de protéines coloré au bleu de Coomassie, lorsqu'elles sont exprimées à partir du chromosome ou d'un plasmide à copies multiples. Seule, la protéine MdoG a pu être révélée à partir d'un plasmide à copies multiples où le gène *mdoH* était interrompu.

3°) MISE EN EVIDENCE D'UN PROMOTEUR SECONDAIRE POUR *mdoH*

Etant donné que les plasmides pNF423 et pNF424 placés dans la souche NFB216 (*mdoH200::Tn10*) permettent le rétablissement de la biosynthèse du MDO à un niveau 1,5 fois supérieur au niveau sauvage (Tableau III, page 53), on pouvait penser que le promoteur naturel était responsable de l'expression de *mdoH*. Cependant, il avait été montré, par Lacroix et coll., (1991), qu'une fusion *mdoH-lacZ* s'exprimait faiblement grâce à un promoteur faible situé au sein même de *mdoG*. Afin d'aller plus loin et de s'assurer que le gène *mdoH* possédait réellement son propre promoteur, dont la séquence serait suffisamment différente du consensus pour qu'il n'est pas été mis en évidence précédemment, j'ai placé le fragment *Bam*HI du plasmide pNF309 (contenant le gène *mdoH*) au site *Bam*HI du plasmide pNF150 (décrit Figure 31, page 86). Les deux orientations possibles ont abouties au plasmide pNF318, quand *mdoH* est sous le contrôle du promoteur *placUV5*, et au plasmide pNF417 quand *mdoH* est placé dans le sens opposé (Figure 19). Ces deux plasmides ont été introduit dans la souche NFB216 et leur capacité à restaurer la biosynthèse du MDO a été mesurée (Figure 20, page 58). Les résultats indiquent que le plasmide pNF318 se comporte de la même façon que le plasmide pNF309, avec une augmentation de 1,5 fois la quantité de MDO. Par contre, le plasmide pNF417 permet lui aussi de restaurer la biosynthèse du MDO, mais à un niveau 0,5 fois inférieur au niveau d'une souche sauvage.

Ces résultats laissaient à penser que le fragment *Mlu*I-*Ssp*I possédait des séquences suffisantes à l'expression d'une faible quantité de protéine MdoH permettant ainsi une restauration partielle de la quantité de MDO. Toutefois, on pouvait expliquer ce résultat d'une autre manière. En effet, dans un plasmide, il existe un certain nombre de séquences promotrices putatives qui permettraient ainsi la transcription de *mdoH* à un faible niveau. Afin de tenter d'éliminer cette hypothèse, j'ai placé dans le plasmide pNF417 l'interposon oméga au niveau du site *Hind*III. L'interposon oméga est muni à ces

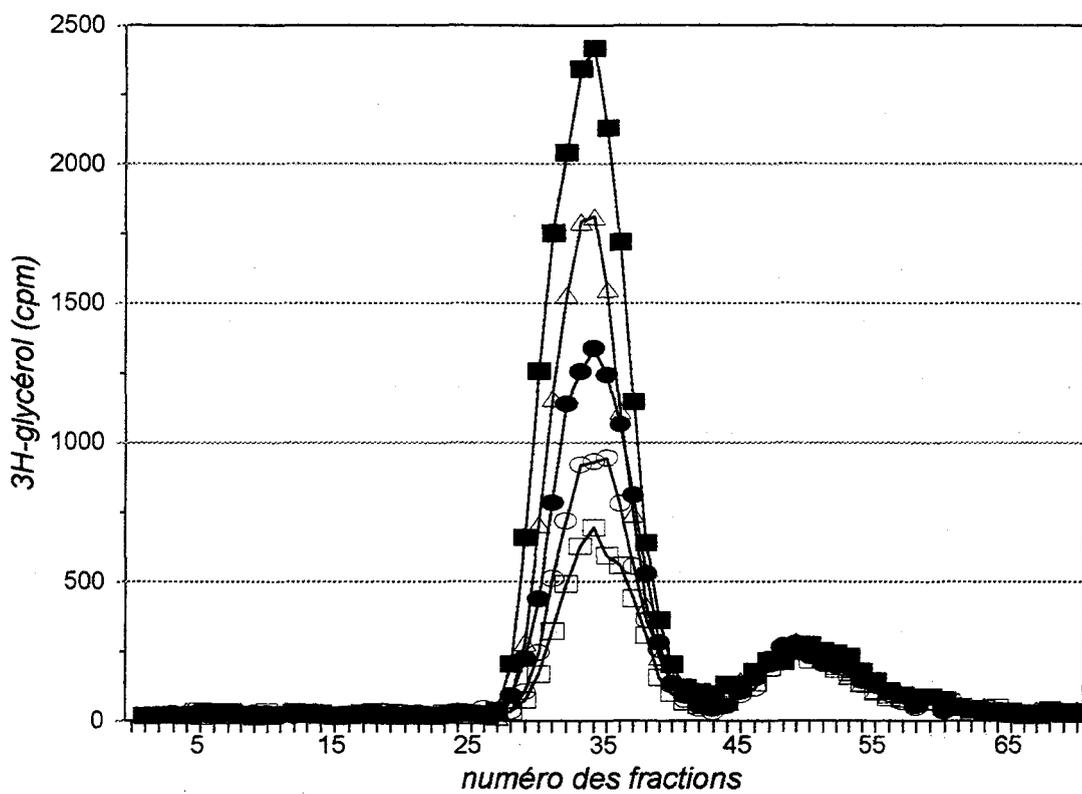


Figure 20 : Chromatographie sur Sephadex G25 des extraits pyridine des souches :

quantité de MDO / souche sauvage

△	pYZ4 / JM83	100 %
■	pNF318 / NFB216	150 %
□	pNF417 / NFB216	50 %
●	pNF428 / NFB216	85 %
○	pNF429 / NFB216	60 %

deux extrémités de séquences possédant des signaux de terminaison de la transcription et des codons stop dans chacun des trois cadres de lecture possibles. Le plasmide ainsi obtenu, pNF428 (Figure 19, page 56) permet encore une restauration partielle de la quantité de MDO, mais à un niveau différent de celui obtenu avec le plasmide pNF417, et toujours à un niveau inférieur au niveau sauvage (Figure 20).

Puisque l'interposon oméga est muni à ses deux extrémités de séquences identiques empêchant l'action d'un promoteur extérieur, les deux orientations de celui-ci devaient conduire au même résultat. Le plasmide possédant l'interposon oméga dans l'orientation inverse à celle de pNF428, est pNF429, et ce plasmide permet toujours une restauration partielle de la quantité de MDO, mais à un niveau différent à celui obtenu avec pNF428.

L'ensemble de ces différents dosages nous indiquent que le fragment *MluI-SspI* posséderait une séquence promotrice, permettant l'expression de *mdoH*, qui n'a jamais pu être mise en évidence lors d'une recherche d'homologie avec les séquences promotrices consensus. De plus, le fait que les deux orientations de l'interposon oméga ne conduisent pas au même niveau d'expression, et que ces niveaux soient différents de celui obtenu avec le plasmide pNF417, semblerait indiquer que ce promoteur secondaire potentiel serait sensible à la conformation locale de l'ADN. L'intervention de la conformation de l'ADN sur l'expression de ce promoteur secondaire est renforcée par le fait que le fragment *SacII-SspI* (de coordonnées 3,2-7 kb sur la Figure 11, page 44) placé dans pUC8 contre le promoteur *plac* ne permet pas de restaurer une quantité de MDO repérable (Lacroix, communication personnelle). Enfin, il faut noter que toutes les expressions de *mdoH*, par le promoteur *placUV5* ou par le promoteur secondaire, conduisent à une quantité de MDO qui reste toujours soumise à une régulation par l'osmolarité du milieu.

4°) LA PROTEINE MdoG LIMITE LA QUANTITE DE MDO

Le dosage des plasmides pNF423 et pNF424 a mis en évidence que le gène *mdoH* exprimé à partir du promoteur de l'opéron permettait l'obtention d'une amplification de la quantité de MDO. Cette amplification est du même niveau que celle obtenue à partir de l'expression du gène *mdoH* sous le contrôle de *placUV5*. Donc, que le gène *mdoH* s'exprime à partir du promoteur de l'opéron, ou à partir d'un promoteur exogène fort, il ne permet d'obtenir qu'une amplification d'un facteur 1,5, à comparer au facteur 3 obtenu avec l'expression de *mdoG* seul à partir d'un plasmide à copies multiples (Lacroix et coll., 1991). Ce niveau 3 est aussi obtenu lorsque le locus *mdoGH* est exprimé à partir d'un plasmide à copies multiples. Ceci signifie donc que MdoG est la seule protéine de l'opéron qui puisse limiter la quantité de MDO. Et dans le cas de la surexpression de MdoH, la

quantité sauvage de MdoG est suffisante pour permettre d'atteindre le niveau 1,5. A moins que la surexpression de MdoH ait une influence sur l'expression de *mdoG*.

II : ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE MdoH

A : LE SYSTEME GLUCOSYLTRANSFERASE *IN VITRO*

1°) L'ACTIVITE GLUCOSYLTRANSFERASE EST MEMBRANAIRE

Le système *in vitro* décrit par Weissborn et Kennedy (1984), a permis la mise en évidence d'une activité enzymatique réalisant la polymérisation, à partir d'une amorce, d'une chaîne de glucoses liés en β ,1-2. Cette activité est illustrée par la figure 21, page 62. L'amorce artificielle utilisée est l'octyl β -D-glucoside. D'autres types d'amorces ont été utilisées, et il en ressort qu'il est nécessaire que la molécule amorce possède une partie glycosidique de type β . La partie octyl n'est pas négligeable, car elle permet de doubler la quantité de produit final par rapport au sophorose (glc β ,1-2glc), deuxième amorce la plus efficace. Il est intéressant de noter que les auteurs ont constaté l'apparition d'une faible quantité de produit même en absence d'amorce. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que leur préparation membranaire possède la molécule amorce naturelle en faible quantité. L'ajout de fractions solubles issues de souches sauvages ou mutées au locus *mdoG* n'a aucun effet sur la quantité des produits obtenus (Bayan, 1990). Ce système ne permet donc pas de caractériser la fonction de la protéine MdoG. Enfin, depuis sa mise au point, très peu de changements ont été effectués, et aucune information supplémentaire concernant les différentes étapes de la construction du squelette glucidique n'a été apportée.

Le bactoprénol est un accepteur lipidique utilisé dans les voies de biosynthèse du peptidoglycane et de la partie antigène O du LPS. Il sert d'accepteur lipidique à des oligosaccharides précurseurs, leur permettant de passer du cytoplasme vers le périplasme. Weissborn et coll., en 1991, ont mis en évidence que l'addition de polyprényl phosphate (analogue structural du bactoprénol) permet d'augmenter la quantité de produits obtenus dans le système *in vitro*. Mais il n'a pas été possible de préciser exactement le rôle de cette molécule. De plus, pour additionner le polyprényl phosphate, il a été nécessaire de le solubiliser par un détergent qui, seul, inhibe partiellement l'activité glucosyltransférase. On peut donc se demander si l'augmentation de l'activité est réellement due au polyprényl phosphate, qui servirait d'accepteur, ou à un effet secondaire de l'action du détergent sur la préparation membranaire. De plus, il a été démontré par Harkness et coll. (1990) que le bactoprénol n'est pas utilisé *in vivo* comme accepteur lors de la biosynthèse du MDO. En effet, le blocage de la régénération du bactoprénol par la colicine M n'a aucun effet sur la biosynthèse du MDO, alors qu'il inhibe celles du peptidoglycane et de la partie antigène O du LPS (Harkness et Braun, 1989a ; 1989b).

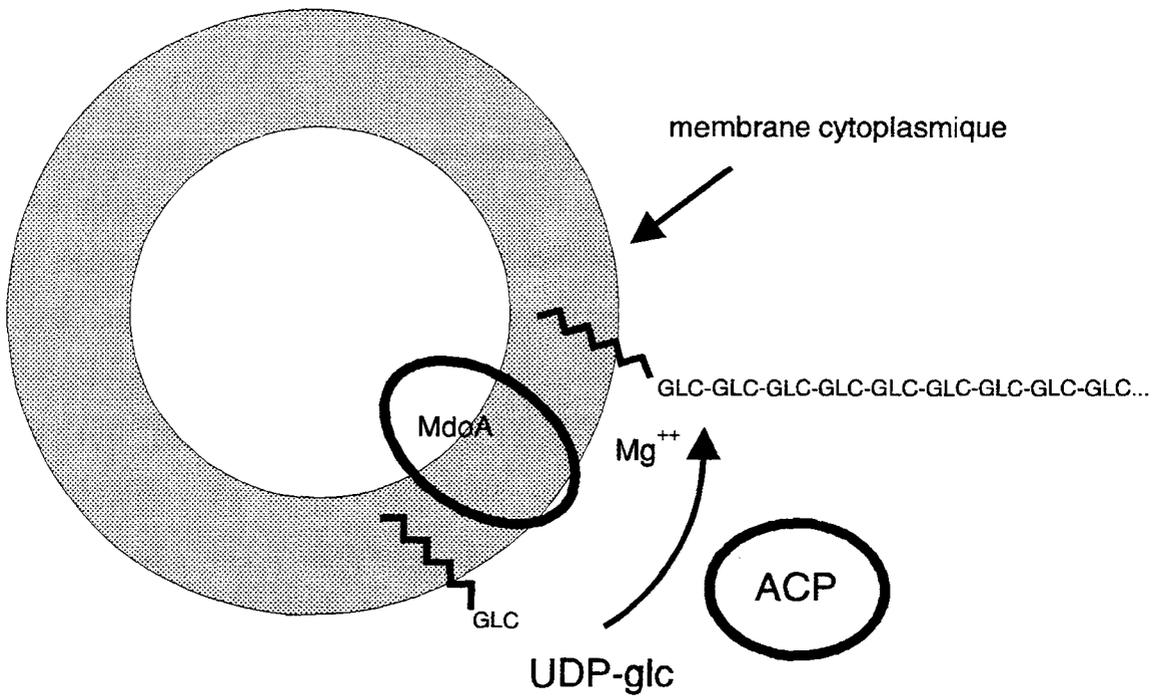


Figure 21 : Représentation schématique du système *in vitro* mis au point par Weissborn et Kennedy (1984) permettant de révéler une activité glucosyltransférase

Donc, bien qu'il existe toujours la possibilité d'un accepteur de nature lipidique, on doit reconnaître que le mécanisme permettant le passage des molécules de MDO naissantes du cytoplasme vers le périplasme est différent de celui décrit pour les autres oligosaccharides extracytoplasmiques (lipolysaccharide, peptidoglycane, exopolysaccharides). De plus, la biosynthèse du MDO est inhibée par l'ajout de chloramphénicol (J.-M. Lacroix, 1989) ce qui signifie qu'au moins une protéine doit être constamment synthétisée. Une conclusion identique a d'ailleurs été avancée dans la biosynthèse des acides polysialiques d'*E. coli* K1 (Whitfield et Troy, 1984). Depuis, il a été montré qu'une protéine membranaire de 20 kDa est l'accepteur nécessaire, en plus du bactoprénol, à la formation d'acides polysialiques *in vivo* (Weisgerber et Troy, 1990). Il existe donc une alternative à propos de la nature de l'accepteur qu'utiliserait les molécules naissantes de MDO.

2°) LA STRUCTURE DES PRODUITS FORMES EST DIFFERENTE DE LA STRUCTURE DU MDO

Weissborn et Kennedy ont montré que le système *in vitro* permettait l'obtention de deux produits (pics B et C de la Figure 22, page 64). L'un, le pic B, d'une taille proche de celle des molécules de MDO (soit 6 à 10 unités de glucose), et l'autre, le pic C, d'une taille plus importante (environ 30 unités de glucose). Ces deux produits ne sont constitués que de glucoses liés en β ,1-2. Le rapport entre le nombre d'unités de glucose et le nombre de molécule amorce (octyl β -D-glucoside) est de 14 à 20. Ceci pourrait signifier que le processus de biosynthèse du MDO débute par la polymérisation d'une chaîne de glucose liés en β ,1-2, puis est suivie d'une étape de réarrangement qui permet l'obtention d'une molécule ramifiée par des liaisons en β ,1-6. Cette étape resterait impossible dans ce système *in vitro*, car elle pourrait nécessiter des interactions membranaires détruites lors de la préparation des membranes. Cependant, la présence d'un produit de taille 3 fois plus importante que celle du MDO permet de douter de la conclusion précédente. En effet, des produits d'une telle taille n'ont jamais été mis en évidence précédemment *in vivo*. Il convient donc de supposer que ces produits sont dus à un dysfonctionnement de l'activité enzymatique. De ce fait, il est probable que les molécules ayant une taille proche de celle du MDO n'aient pas exactement la même structure que les précurseurs existant *in vivo*. Il convient donc d'être prudent, et de reconnaître ainsi qu'aucune donnée certaine concernant les premières étapes de la biosynthèse du MDO n'est connue à ce jour.

En 1991, Weissborn et coll. pensaient pouvoir montrer que la biosynthèse du MDO avait lieu sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. Ils ont alors cultivé une souche mutée au locus *galU* (codant la glucose-1P-uridylyltransférase, voir Figure 3, page 22) en présence d'UDP-glucose radiomarqué. Cette expérience ne leur a pas permis d'obtenir de MDO. Ils expliquaient alors que l'UDP-glucose était certainement hydrolysé dans le périplasme par des pyrophosphatases de

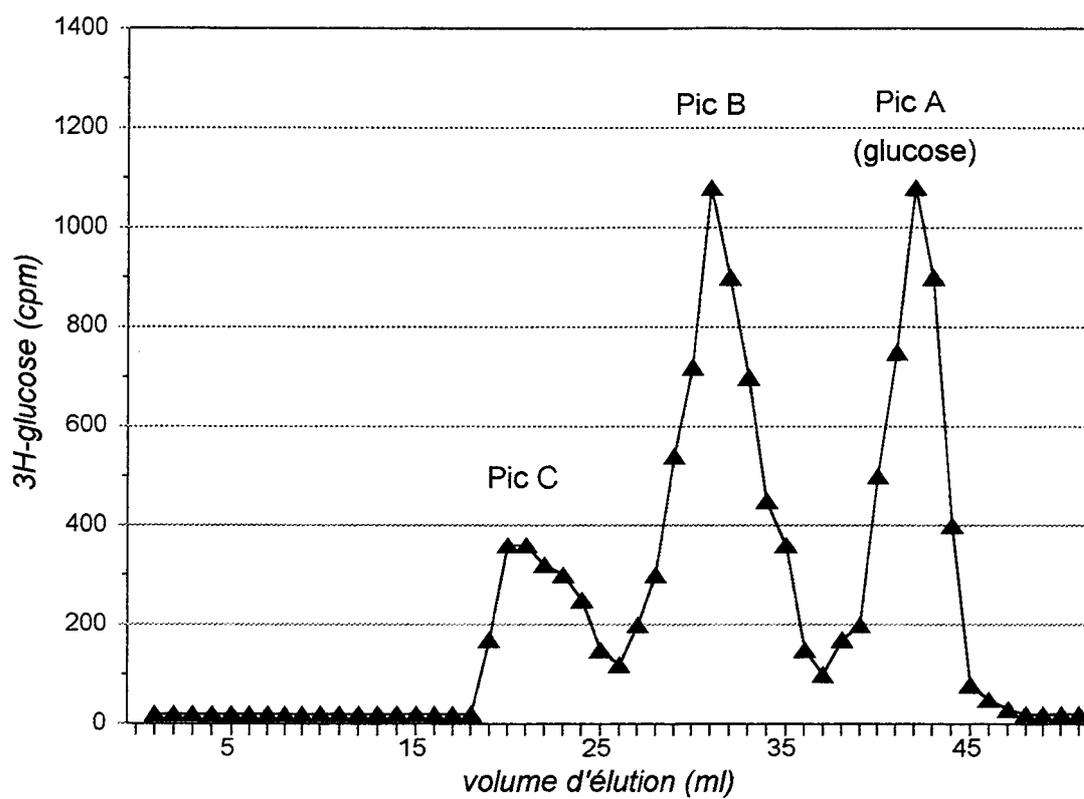


Figure 22 : Profil chromatographique des produits du système glucosyltransférase *in vitro* de Weissborn et Kennedy (1984).

nucléotide-sucré, et qu'ainsi il était peu probable que la biosynthèse du MDO débute dans le périplasma. En s'inspirant de cette idée, nous avons essayé de contourner le problème due aux pyrophosphatases, en tentant de faire pénétrer l'UDP-glucose dans le cytoplasme, sans qu'il soit dégradé par les enzymes périplasmiques. Cette nouvelle approche devait nous permettre de révéler l'activité glucosyltransférase au sein même de la cellule, et espérer ainsi pouvoir mieux comprendre les premières étapes de la voie de biosynthèse du MDO.

B) MISE AU POINT D'UN NOUVEAU SYSTEME PERMETTANT LA REVELATION DE L'ACTIVITE DE MdoH *IN VIVO*

1°) LA TECHNIQUE MIS AU POINT CHEZ *Rhizobium meliloti*

Pour trouver une nouvelle méthode permettant de révéler l'activité glucosyltransférase nous avons recherché les techniques qui avaient été employées chez d'autres bactéries pour l'étude d'activités glucosyltransférases. Ainsi, Tolmasky et coll. (1982) peuvent mettre en évidence, chez *Rhizobium meliloti*, une activité glucosyltransférase en incubant de l'UDP-glucose avec des cellules congelées et décongelées plusieurs fois. Cette technique, simple à mettre en oeuvre, est basée sur l'utilisation de cellules entières. Elle devait ainsi nous permettre d'obtenir des molécules de MDO complètes.

2°) LA TECHNIQUE MISE AU POINT CHEZ *E. coli*

a) Le choix de la souche

En s'inspirant de la technique précédemment décrite pour *R. meliloti*, nous avons voulu tenter de mettre en évidence l'activité glucosyltransférase nécessaire à la biosynthèse du MDO *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi la souche CA10 mutée au niveau du gène *galU*. Cette souche ne peut pas synthétiser d'UDP-glucose, et ne peut donc pas synthétiser du MDO, sans l'apport exogène d'UDP-glucose.

b) Brève description de la technique

La perméabilisation de la souche CA10 par un choc hypothermique (environ -70°C) a été effectuée dans de nombreuses conditions afin de pouvoir déterminer celles qui permettraient de révéler l'activité glucosyltransférase. Tout d'abord, j'ai vérifié que cette souche ne pouvait pas utiliser l'UDP-glucose comme précurseur du MDO sans qu'elle n'ait été perméabilisée par un choc cryologique. Puis, j'ai effectué différents essais afin de déterminer quelles étaient les conditions nécessaires à la biosynthèse de MDO à partir du stock d'UDP-glucose introduit dans les cellules. Ces

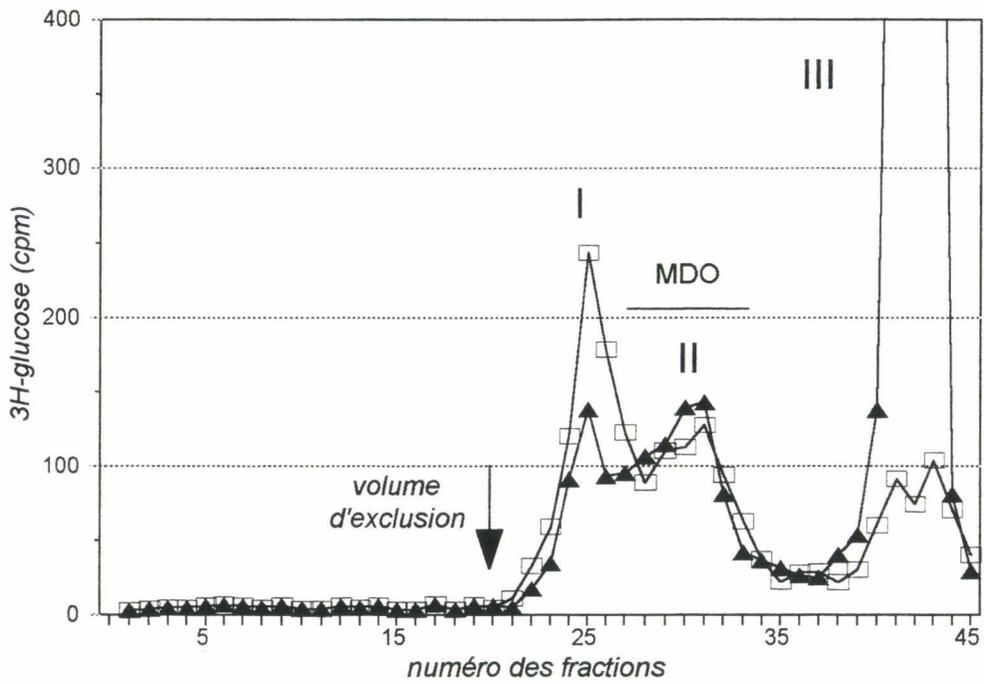


Figure 23 : Chromatographie sur Biogel P4 des extraits pyridine après la perméabilisation de la souche CA10 :

▲ : après 2h de culture en LOS

◻ : après 16h de culture en LOS

Les valeurs des fractions 41, 42, et 43 de l'extrait pyridine de l'essai à 2h sont respectivement de 1052, 1825, et 864 cpm.

essais ont porté sur le nombre et la durée des chocs hypothermiques, sur la concentration optimale d'UDP-glucose, et enfin sur la durée suffisante à la biosynthèse de MDO. Les conditions suivantes ont été choisies comme conditions standards pour perméabiliser les cellules : un seul choc hypothermique d'une durée de 2 minutes dans le milieu réactionnel, suivi d'une incubation de 10 minutes à 37°C, puis les cellules sont centrifugées et mises en culture dans le milieu LOS pendant une durée de 2 heures (voir fiche technique N°5). La détection de l'activité glucosyltransférase s'effectue par la technique classique d'extraction du MDO au charbon de bois (voir fiche technique N°6). Les extraits pyridine sont alors passés sur une colonne de filtration sur gel de type Biogel P4.

c) Les résultats obtenus

En appliquant les conditions optimales précédentes, on obtient 3 pics dans le profil d'élution chromatographique (Figure 23). Le pic III correspond à la quantité d'UDP-glucose qui n'a pas été utilisée, le pic II est élué au même niveau que le MDO, et le pic I est un produit de taille supérieure.

Il faut remarquer qu'une durée d'incubation de 2h à 37°C après le choc hypothermique ne permet pas d'obtenir une quantité de matériel dans le pic II supérieure à celle obtenue après une incubation de 10 min. De même, le fait de mettre les cellules en culture pendant toute une nuit, ne permet pas non plus d'obtenir une plus grande quantité de matériel dans le pic II, par rapport à une durée de 2h (Figure 23). Enfin, si on laisse les cellules en contact avec le milieu réactionnel toute une nuit sans les mettre en culture, on n'obtient pas de matériel radioactif quantifiable au niveau du pic II.

Pour prouver que le pic II est bien constitué de MDO, il nous fallait tester des souches mutantes pour la biosynthèse du MDO. Au laboratoire, il a été construit, à partir de la souche *galU*, des dérivées dont les gènes *mdoG*, ou *mdoH*, ou *mdoG* et *mdoH* ont été interrompus. Les résultats obtenus lors de la perméabilisation de ces nouvelles souches sont très encourageants. En effet, aucune des 3 nouvelles souches ne permet l'obtention du pic II qui apparaît donc bien être spécifique du MDO (Figure 24, page 68). Ceci signifie donc que ce système de dosage *in vivo* d'une activité glucosyltransférase permet de révéler l'activité glucosyltransférase impliquée dans la biosynthèse du MDO.

Le pic I est quant à lui, probablement constitué de fragments de LPS, car dans un mutant *galU*, il ne manque que l'UDP-glucose pour que la biosynthèse du LPS puisse s'achever (Rick, 1987). En

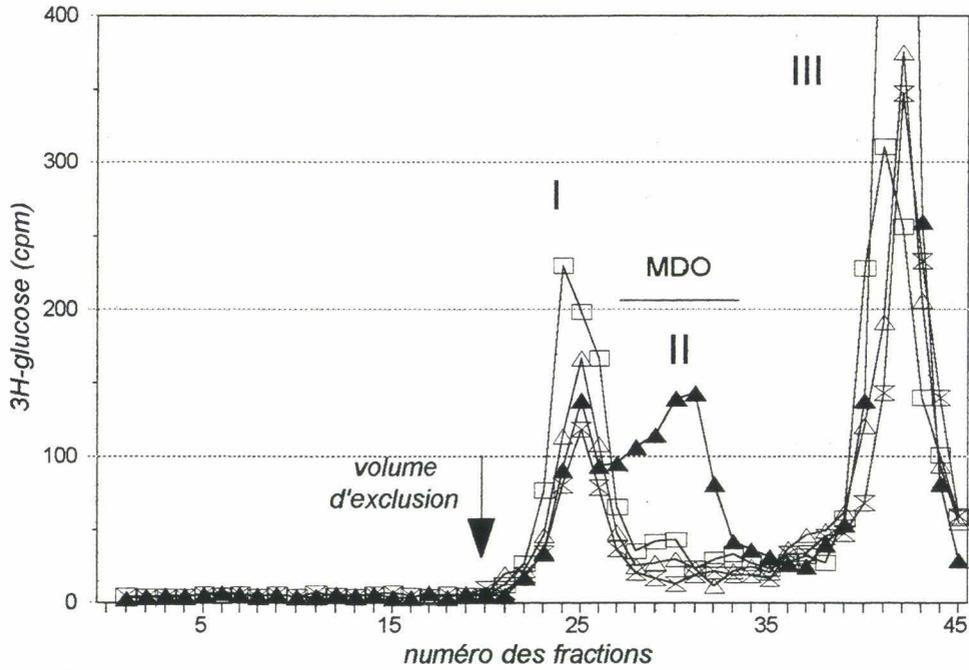


Figure 24 : Chromatographie sur Biogel P4 des extraits pyridine après la perméabilisation (dans les conditions standards) des souches :

- ▲ : CA10
- ◻ : CA10 *mdoG*⁻
- ◻ : CA10 *mdoH*⁻
- ⊠ : CA10 *mdoG*⁻ *mdoH*⁻

Les valeurs des fractions 41 et 42 de l'extrait pyridine de la souche CA10 sont respectivement de 594 et 933 cpm.

effet, une souche NFB724 (DF214, *mdoG*), cultivée en LOS en présence de ^{14}C glucose synthétise une faible quantité de LPS (voir Figure 17, page 53).

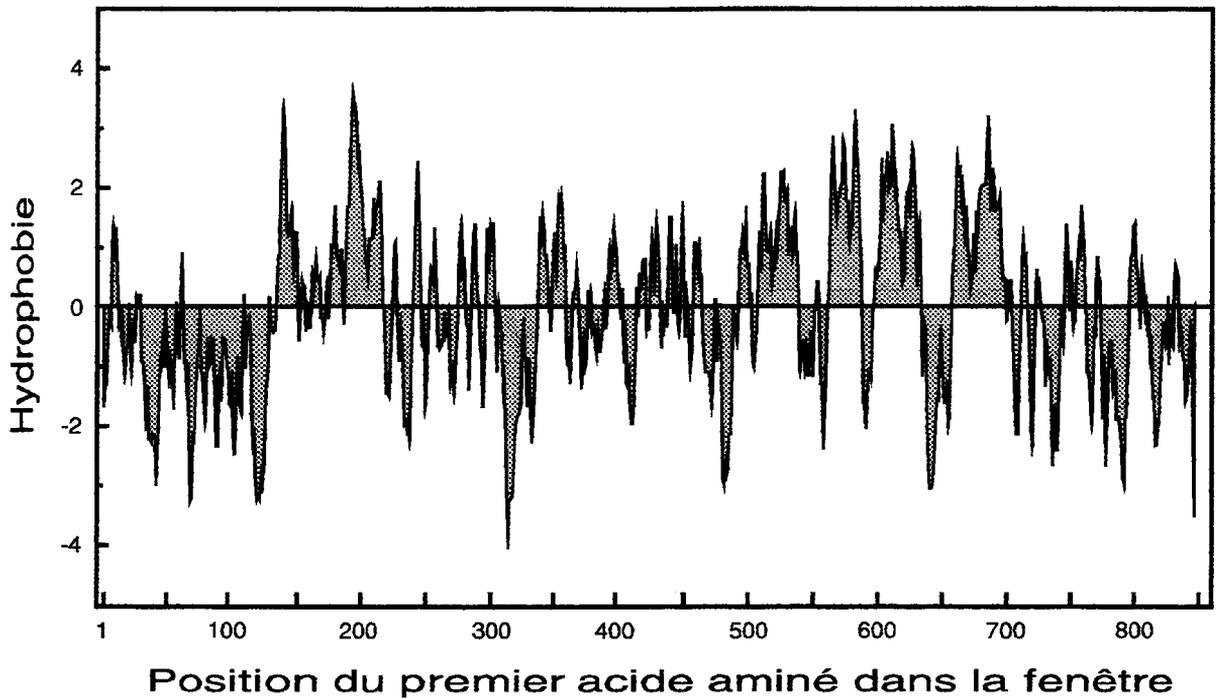


Figure 25 : profil d'hydrophobie de la protéine MdoH d'après la méthode de Kyte et Doolittle, avec une fenêtre de 7 acides aminés.

```

120TKEEQESEQKWRVTGTRIRYILLILTTLAQTVVATWYMKTILPYQGWALINPMDMVGQDLWV
  iHHhHiHhIhihBiIiiHHIHiHHhihhHihbhIiIHBbhBhHHIbBhihhBhiHh
SEMQLPYMLQGTGILILFAVLFCWVSAGFWTALMGFLQLL220
ihhhHBbhHHiBIHIHHHhhihhiHBhhiHHhBhHH
500LFLVKGMHPVHRAGFLTGVMSYLSAPLWFMFALALSTALRVVHALTEPQYFLQPRQLFPVWP
  HhHHIBhhBhhiHBHiBhhiHiHBhhhhhHHHiiHHihhhHHiHBhbhHHBihHHBhhB
QWRPELAIALFASTMVLLFLPKLLSILLIWCKGTKEYGGFWRVTLSSLLEVLFSVLLAPVRML
hhiHHHHHHHiihhHHhBIHHiIHHIhiIBiIhBBhhihiHiHHHHhHihHHHBhihH
FHTVFVVS AFLGWVVWNSPQRDDDSTSWGEAFKRHGSQLLGLVWAVGMAWLDLRF LFWLAP
hhihhhiHhHBHhhbiBhiiiiiiihHHhIihBihHHHBhhHhBhHHHiHihHHhHHB
IVFSLILSPFVSVI700
IhhiHIHiBhhiI

```

Figure 26 : extraits de la prédiction de la structure secondaire de la protéine MdoH d'après la méthode de Chou et Fasman. Seules sont indiquées les prédictions pour les régions 120 à 200, et 500 à 700

H signifie : probabilité forte de former une hélice α
 I signifie : probabilité faible de former une hélice α
 b signifie : probabilité d'interrompre une hélice α

h signifie : probabilité moyenne de former une hélice α
 i signifie : résidu dont la conformation est neutre
 B signifie : probabilité forte d'interrompre une hélice α

III : ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE MdoH

A) DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES PROTEINES MEMBRANAIRES

1°) LES METHODES DE PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES

a) Calcul du caractère hydrophobe de la chaîne polypeptidique

α) La méthode de calcul de Kyte et Doolittle

Cette méthode attribue à chaque acide aminé une valeur relative reflétant son hydrophilie ou son hydrophobie. Les acides aminés hydrophobes ont une valeur positive, et les hydrophiles une valeur négative. Par exemple, le calcul de la moyenne des 7 premiers résidus de la protéine conduit à une valeur qui est attribuée au résidu numéro 4. Puis le programme calcule la moyenne des valeurs des résidus 2 à 8, et l'attribue au résidu numéro 5. Ainsi, une fenêtre de 7 résidus se déplace acide aminé par acide aminé le long de la séquence, et attribue une valeur moyenne qui peut être reportée sur un graphe. Le calcul de la moyenne peut s'effectuer sur 5, 7, 9, 11, ou même 13 résidus, sachant que la meilleure résolution est obtenue pour une moyenne calculée sur 7 à 11 acides aminés (Kyte et Doolittle, 1982).

Le résultat de ce calcul, appliqué à la séquence de MdoH, est présenté figure 25. On remarque qu'il existe deux larges régions très hydrophobes (acides aminés numéro 120 à 220, et 490 à 700), et cinq pics hydrophiles (acides aminés numéro 40, 110, 310, 480 et 640). Un tel profil, présentant de larges pics hydrophobes avec des valeurs d'hydrophobie supérieures à 3, est caractéristique de protéines ancrées dans la membrane.

β) Bref aperçu des autres méthodes

A côté de la méthode de calcul de Kyte et Doolittle, souvent rencontrée dans les publications, il existe de nombreuses autres méthodes permettant d'estimer le caractère hydrophobe ou hydrophile d'une séquence d'acides aminés. Degli Esposi et coll. (1990), ont d'ailleurs publié une comparaison de plus de 20 méthodes permettant de déterminer le profil d'hydrophobie des protéines membranaires. La plupart utilisent la même approche que celle décrite pour Kyte et Doolittle, c'est à dire un calcul de l'hydrophobie. Un autre type d'approche consiste à repérer des régions hydrophobes en comparant la séquence de la protéine étudiée avec une ou plusieurs autres séquences de protéines ayant des fonctions proches (Gaboriaud et coll., 1987).

Actuellement, ces méthodes prennent souvent en compte des calculs de prédictions de la conformation des chaînes d'acides aminés, afin de donner une évaluation de plus en plus précise du nombre et de la position des segments transmembranaires. Enfin, l'obtention d'un plus grand nombre

de protéines membranaires cristallisées permettra de tester l'efficacité de ces prédictions, qui deviennent régulièrement plus fiables (Fasman et Gilbert, 1990).

b) Prédiction de la structure secondaire de la chaîne polypeptidique

α) Le calcul selon la méthode de Chou et Fasman

Ce calcul est basé sur la potentialité de chaque acide aminé à former une hélice α , ou un feuillet β , ou encore une boucle ou un coude. Le potentiel de chaque résidu est cumulé avec le potentiel des résidus suivants, puis divisé par le nombre de résidus. Ainsi pour chaque résidu, on obtient une valeur moyenne indiquant sa probabilité d'appartenir à l'un des trois états conformationnels possibles. Pour la prédiction des hélices α la moyenne est faite sur 6 résidus, et sur seulement 4 pour les feuillets β et les boucles. Chacune des valeurs moyennes est ensuite comparée aux valeurs moyennes des résidus voisins. Enfin, il existe plusieurs directives permettant de déterminer si l'ensemble des prédictions peut conduire réellement à la formation d'hélices α ou de feuillets β (Chou et Fasman, 1978). Ces directives sont résumées par une règle générale :

- la prédiction de formation d'hélice α est fiable lorsque la valeur moyenne (d'appartenir à une hélice α) de 6 résidus consécutifs est supérieure à 1,03, et que pour chaque résidu, son potentiel d'appartenir à une hélice α est supérieur à celui d'appartenir à un feuillet β .
- la prédiction de formation d'un feuillet β est fiable lorsque la valeur moyenne (d'appartenir à un feuillet β) de 4 résidus consécutifs est supérieure à 1,05, et que pour chaque résidu, son potentiel d'appartenir à un feuillet β est supérieur à celui d'appartenir à une hélice α .

La figure 26 (page 70) donne un extrait des valeurs obtenues par le calcul de Chou et Fasman uniquement pour les régions hydrophobes MdoH. En effet, nous avons utilisé ces calculs prédictifs dans le but de nous donner des indications sur la conformation des segments transmembranaires potentiels. Toutefois, nous pouvons mentionner qu'en dehors des régions hydrophobes, il ne nous est pas apparu de régions consécutives ayant une conformation particulière.

β) Le calcul selon la méthode de Gibrat, Garnier et Robson

Dans cette méthode, chaque acide aminé possède aussi son propre potentiel à appartenir à une conformation de type hélice α , ou feuillet β , ou encore de type boucle. Ce potentiel est calculé à partir d'une base de données contenant 11237 résidus. La méthode est en fait un algorithme qui compare les valeurs de chaque résidu avec les valeurs des résidus voisins, et qui en déduit une prédiction. Cette prédiction est effectuée pour chacun des trois états conformationnels. Cette méthode est beaucoup moins stricte que la précédente, et permet de faire apparaître de très longues

série d'acides aminés dont la prédiction de conformation est identique (Gibrat et coll., 1987). La précision globale de la prédiction est estimée à 63%, ce qui est une valeur assez bonne.

La figure 27 (page 74-75) donne le résultat de la prédiction de structure secondaire effectuée sur la protéine MdoH. On remarque la très forte proportion de résidus prédits sous forme d'hélice α (45 % du total), avec de très longues séries de 15 à 25 résidus consécutifs. A l'opposé, il y a une faible proportion de résidus prédits sous forme de feuillets β (15 % du total). Ceux-ci sont souvent regroupés en séries de 3, 4 ou 5 résidus consécutifs, et ces séries sont souvent précédées ou suivies d'une série de résidus prédits sous forme d'hélice α . Ceci pourrait signifier, par exemple, que les feuillets β participent au maintien de la conformation des hélices α impliquées dans des segments transmembranaires.

γ) Bref aperçu des autres méthodes

Cette fois encore, un grand nombre de méthodes permettent de prédire la conformation d'une chaîne d'acides aminés. Ces méthodes, qui ne sont pas spécifiques des protéines membranaires, sont optimisées à chaque fois qu'une protéine est cristallisée. Ainsi, la fiabilité de la prédiction est passée de 62 à 70% en 6 ans. Lorsque ces méthodes prennent aussi en compte les homologies existant entre les protéines d'une même famille, elles permettent une prédiction encore plus fiable (Rost et coll., 1993).

c) Prédiction de l'organisation membranaire de la protéine MdoH

En corrélant les données obtenues par le calcul du caractère hydrophobe, selon la méthode de Kyte et Doolittle, et celles obtenus par la prédiction des structures secondaires, selon la méthode de Gibrat et coll., on peut tenter de déterminer le nombre des segments transmembranaires de MdoH (Figure 28, page 76). Suivant que l'on donne la priorité à l'hydrophobie ou à la conformation hélicale, on ne peut que prédire qu'il existe au moins 2 segments dans la première région hydrophobe, et au moins 6 dans la deuxième. En aucun cas, on ne peut préciser le nombre exact de ces segments et encore moins trancher sur leurs limites précises. De plus, on ne peut absolument pas prédire la localisation cytoplasmique ou périplasmique de la grande région centrale, ainsi que de la région carboxylique. Quant à la région aminée, on pense qu'elle est cytoplasmique, car une fusion de gène avec la β -galactosidase au niveau du 25ème codon est parfaitement active (Lacroix et coll., 1991). Ainsi, les méthodes prédictives se révèlent très insuffisantes pour établir un modèle de la topographie de MdoH. C'est pourquoi, lorsque ce travail a été initié en 1992, nous nous sommes tournés vers la technique de fusion de gènes avec la β -lactamase, technique qui était alors peu utilisée.

```

          10          20          30          40          50
SEQU : MNKTTEYIDAMPIAASEK GALPKTDIRAVHQALDAEHRTWAREDDSPQGS
PRED : HCCCCHHCHHCHHHHHHHCHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHEHCCCCCCCCC
CLAS : 13433221231133213131431233454342334322211234454333

          60          70          80          90          100
SEQU : VKARLEQAWPDSLADGQLIKDDEGRDQLKAMPEAKRSSMFPDPWRTNPVG
PRED : HHHHHHHCCHHHHHHCHEECHHHHCCHHHHHHCCHHCCCCCCCCCCCCCCCCC
CLAS : 12313421211223122213112213343121331133224542325424

          110         120         130         140         150
SEQU : RFWDRLRGRDVTPRYLARLTKEEQESEQKWRTVGTIRRYILLILTIAQTV
PRED : CEEHHECCCCCCHHHHHHCCHHHHHHHHHHHHEECEHEHHHEEHHHHHHHH
CLAS : 1321112433332123212233333233221321111112111331332

          160         170         180         190         200
SEQU : VATWYMKTILPYQGWALINPMDMVGQDLWVSMQQLPYMLQTGILILFAV
PRED : HHHHHEEEECCECCCHCCECCHCCHCCCHHHHHHHHHCCHHHHHHHEEHEHE
CLAS : 23122112123133111153112233312224333111223313211121

          210         220         230         240         250
SEQU : LFCWVSAGFWTALMGFLQLLIGRDKYSISASTVGDEPLNPEHRTALIMPI
PRED : HEEHCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCECCCCCECCCCCCHCCHHHCCCE
CLAS : 2121122421235344532213321121231124444451211212121

          260         270         280         290         300
SEQU : CNEDVNRVFAGLRATWESVKATGNAKHFDVYILSDSYNLDICVAEQKAWM
PRED : CCCCCCHEHHCCHHCHHHHHHCCCCCECEEEECCECCCHHHHHHHHHHH
CLAS : 33343312123112113333313322111433143544111144333233

          310         320         330         340         350
SEQU : ELIAEVGGEGQIFYRRRRRRVKRKSGNIDDFCRRWGSQYSYMVVLDADSV
PRED : HHHHHCCCCCEEEHHCCEEECCCCCCCCCEEECCCCCEEEEEECCCCC
CLAS : 43233144332333111111222435433132211554432354414443

          360         370         380         390         400
SEQU : MTGDCLCGLVRLMEANPNAGIIQSSPKASGMDTLYARCQQFATRVYGPLF
PRED : CCCCCCCEEECCCCCCCCCEEECCCCCCCCCEHHHECHCECCCEECCE
CLAS : 23423333111111353433131453444412131112111311114121

          410         420         430         440         450
SEQU : TAGLHFWQLGESHYWGHNAIIRVKPFIEHCALAPLPGEFSFAGSILSHDF
PRED : EECHHHEHHCCHHHCCCCEHEECCHHHCCCCCCCCCECCCEECHHH
CLAS : 1111111132111131331111321121112555544432132311123

          460         470         480         490         500
SEQU : VEAALMRRAGWGWVIAIDLPGSYEELPPNLLDELKRDRRWCHGNLMNFRL
PRED : HHHHHHHHCHCCEEEECCECCCCCCCCCCHHHHHHHCHHHCCCCCCHHH
CLAS : 4444433312123343145553124423145331211221244311133

```

```

          510          520          530          540          550
SEQU : FLVKGMHPVHRAVFLTGVMSYLSAPLWFMFLALSTALQVVHALTEPQYFL
PRED : HHHCCCCHHCCEEEEEEEHEHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHEHHCCCCHHH
CLAS : 23313131222131312212114313232344432453211122311311

          560          570          580          590          600
SEQU : QPRQLFPVWPQWRPELAIALFASTMVLLFLPKLLSILLIWCKGTKEYGGF
PRED : CCCEHCCCCCHHCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEHECCCCCCCCE
CLAS : 21111233331232444345443444523113343342112354333433

          610          620          630          640          650
SEQU : WRVTLSELLLEVLFSVLLAPVRMLFHTVFFVSAFLGWVWVWNSPQRDDST
PRED : EEEHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCEEEHHHCCHEEEECCCCCCCCC
CLAS : 21113213344534433123222211133112123134314554444443

          660          670          680          690          700
SEQU : SWGEAFKRHGSQLLLGLVWAVGMAWLDLRFVFWLAPIVFSLILSPFVSVI
PRED : CHCHHEHHCCCCHHHEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHHHHHECCCEEEEE
CLAS : 1113112211133112122443333554454232423212113313433

          710          720          730          740          750
SEQU : SSRATVGLRTRKRWKLFLLIPEEYSPQVLVDTRFLEMNRQSLDDGFMHHA
PRED : CCCCEEEHHHHHHHECCCCCCCCCECCCHHHHHHCHHCCCCHCHEHE
CLAS : 21214311123231221332345542221212333322112323121111

          760          770          780          790          800
SEQU : VFNPSFNALATAMATARHRASKVLEIARDRHVEQALNETPEKLNRRRLV
PRED : HHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHCCHHCHHHHEE
CLAS : 11523314454535454122213321333334331131313222212313

          810          820          830          840          850
SEQU : LLSDPVTMARLHFRVWNSPERYSSWVSYYEGIKLNPLALRKPDAASQ
PRED : EECCHHHHHHEEEEEEECCCCCEEEEEEEEHCHHHCHHHHCCHCHHHH
CLAS : 11341233321121323544211132231121235232313132123

```

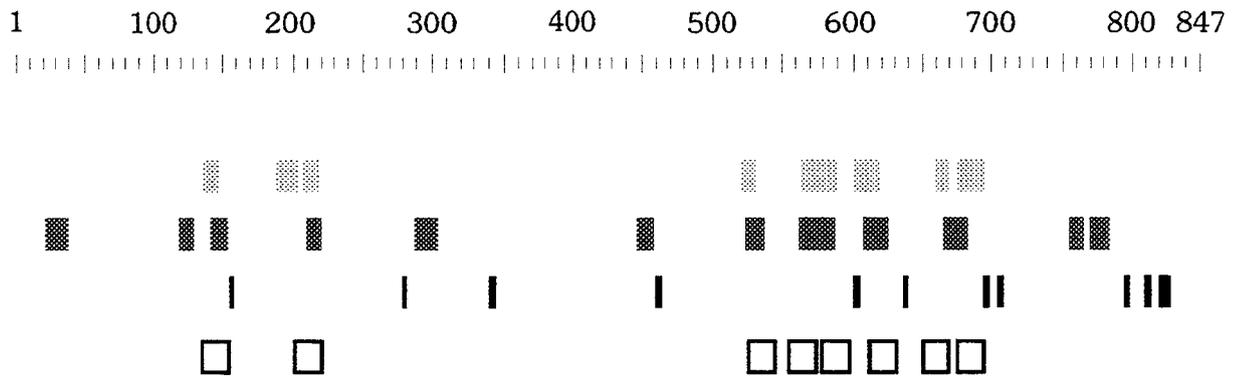
Figure 27 : Résultats des calculs prédictifs effectués à partir de la séquence primaire de MdoH selon l’algorithme de Gibrat, Garnier et Robson.

la lettre H signifie que le résidu est dans un environnement favorable à la formation d’une hélice α .

la lettre E signifie que le résidu est dans un environnement favorable à la formation d’un feuillet β .

la lettre C signifie que le résidu dans un environnement favorable à la formation d’une boucle.

La ligne CLAS indique le niveau de fiabilité de la prédiction. Plus le nombre est élevé, plus la prédiction est fiable.



- ⋯ symbolise au moins 10 valeurs consécutives d'hydrophobicité moyenne supérieure à 1
- symbolise au moins 10 acides aminés consécutifs prédits sous forme d'hélice alpha
- | symbolise au moins 4 acides aminés consécutifs prédits sous forme de feuillets bêta
- symbolise 1 segment transmembranaire possible d'une longueur de 20 acides aminés

Figure 28 : Représentation du caractère hydrophobe et des prédictions de la structure secondaire de la protéine MdoH.

2°) LES METHODES DE FUSIONS DE GENES

Les méthodes de fusion de gènes sont basées sur l'emploi de gènes codant des protéines périplasmiques ayant une activité facilement détectable. Ces gènes, délétés de leur séquence signal, sont fusionnés en aval et en différents endroits du gène codant une protéine membranaire, de façon à produire une protéine hybride. Lorsque la protéine hybride s'insère dans la membrane, il y a différentes possibilités en fonction de la position du point de fusion : soit la partie de la protéine hybride ayant l'activité repérable est localisée dans le périplasma, soit elle est localisée dans le cytoplasme, soit enfin l'activité ne s'exprime pas car la protéine hybride est létale, ou instable, ou encore sa conformation ne permet pas la révélation de l'activité. Dans le périplasma, l'activité sera repérable, alors que dans le cytoplasme, elle ne le sera pas. Il sera donc aisé de différencier les clones exprimant des protéines hybrides permettant la localisation périplasmique de l'activité repérable, de ceux qui ne la permettent pas.

a) Les fusions avec la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme naturellement localisée dans le périplasma d'*E. coli*. Elle est très souvent utilisée pour prouver la localisation périplasmique d'une protéine, car son emploi a été facilité par la mise au point d'un substrat chromogène (de coloration bleue), le XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), permettant de révéler son activité *in vivo* (Figure 29, page 80).

La phosphatase alcaline a été la première enzyme dont l'activité ait été utilisée comme marqueur pour la détermination de la topographie des protéines membranaires. La première technique mise au point utilise le transposon *Tn_{phoA}* (dérivé du transposon *Tn5*) qui possède une faible spécificité d'insertion (Manoil et Beckwith, 1985). Ceci permet à ce transposon de s'insérer en différents endroits dans un gène, chromosomique ou porté par un plasmide. En premier lieu, il faut cribler les insertions qui sont localisées dans le gène d'intérêt. Ensuite, la révélation de l'activité phosphatase alcaline par le XP permet de discriminer les fusions ayant une activité (les clones sont bleus) de celles qui n'en n'ont pas (les clones sont blancs). Les premières signifient que la partie phosphatase alcaline est localisée dans le périplasma, et les secondes qu'elle est localisée dans le cytoplasme.

L'avantage de cette technique est qu'elle utilise une activité facilement détectable, et qu'elle peut être aisément mise en oeuvre. Le principal désavantage est dû à la nature même de la technique, qui fait appel à un transposon dont on ne peut pas diriger l'insertion. La conséquence majeure est la mise en évidence de points chauds d'insertion (Calamia et Manoil, 1990). Ceci sous-entend que certaines régions ne posséderont que très rarement, voire jamais, d'insertion, et qu'ainsi il ne sera pas

possible de déterminer leur topographie. De plus, il est souhaitable de posséder un crible pour sélectionner les insertions localisées dans le gène étudié.

Une deuxième technique permettant d'obtenir une variété de points de fusions plus importante a été mise au point par Sugiyama et coll. (1991). Cette technique, qui s'inspire de celle mise au point précédemment avec la β -lactamase par Broome-Smith et coll. (1990, voir ci-après), permet de résoudre le principal inconvénient rencontré avec le transposon *TnphoA*. En effet, elle consiste à effectuer des délétions *in vitro* du gène étudié et d'y joindre la partie codant la forme mature de la phosphatase alcaline. Ces délétions peuvent être contrôlées et permettent cette fois-ci d'obtenir des fusions en n'importe quel endroit du gène étudié.

Quelle que soit la méthode employée, il a été mis en évidence que certaines fusions possédaient des activités faibles (les clones sont bleus pâles) dans des zones correspondant à des régions périplasmiques (Manoil et Beckwith, 1985). Ces fusions se sont révélées être des fusions négatives. En effet, le séquençage nucléotidique des points de fusions a montré que le gène de la phosphatase alcaline n'était pas en phase avec le gène étudié. Certains auteurs expliquent ce phénomène par l'existence d'une réinitiation interne de la traduction dans un cadre de lecture différent du cadre sauvage, aboutissant ainsi à une faible production de la partie phosphatase alcaline (Manoil et Beckwith, 1985). D'autres avancent l'hypothèse que les gènes étudiés placés dans un plasmide à copies multiples, en aval d'un promoteur fort, conduisent à une expression de la partie phosphatase alcaline indépendamment du cadre de lecture du gène étudié (Broome-Smith et coll., 1990). D'après eux, il existerait un "bruit de fond" qui ne permet pas toujours de différencier une localisation cytoplasmique de la phosphatase alcaline, d'une expression en dehors du cadre de lecture. Cette hypothèse n'a pas pu être remise en question par les travaux de Derman et Beckwith (1991). Ces derniers ont mis en évidence que la phosphatase alcaline qui restait bloquée dans le cytoplasme ne pouvait que très lentement former les ponts disulfures qui sont nécessaires à son activité.

Toutefois, le nombre de fusions qui se sont révélées fausses a toujours été décrit comme faible, bien qu'il ne soit pas négligeable, surtout lorsqu'il s'agit de déterminer la topographie de protéines ayant de nombreux segments transmembranaires potentiels, comme par exemple des transporteurs. Malgré cela, un certain nombre de topographies a été réalisé grâce à des protéines de fusion avec la phosphatase alcaline, sans que cette méthode ait été remise en cause.

b) Les fusions avec la β -lactamase

Cette enzyme confère aux cellules qui l'expriment la résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, comme l'ampicilline. Sa localisation périplasmique est indispensable car ces

antibiotiques ont pour cible des enzymes situées sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique et impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (Spratt, 1983).

Dès 1986, Broome-Smith et Spratt décrivaient la mise au point de plasmides permettant d'effectuer des fusions de gènes avec la partie mature de la β -lactamase. Les différents exemples, pris à titre d'essai, ont permis d'affirmer que l'utilisation de la β -lactamase révélait un intérêt tout particulier. En effet, la distinction entre les fusions cytoplasmiques et les fusions périplasmiques s'effectue grâce à une différence phénotypique vis-à-vis de la résistance à l'ampicilline. Des fusions périplasmiques permettent aux cellules de résister individuellement à l'ampicilline par contre, des fusions cytoplasmiques ne le permettent pas. En revanche, lorsque l'on dépose, sur une boîte de Petri contenant de l'ampicilline, une grande quantité de bactéries exprimant une fusion cytoplasmique, certaines vont résister et croître. Cette résistance collective est due à une diminution locale de la quantité d'ampicilline qui a été hydrolysée par la partie β -lactamase des protéines de fusions issues des cellules qui ont été rapidement lysées (Figure 29, page 80).

Depuis, Broome-Smith et coll. (1990) ont amélioré la technique, et aujourd'hui il est aisé de construire un grand nombre de fusions avec la β -lactamase dans le but de déterminer la topographie d'une protéine membranaire. Ces fusions sont construites *in vitro*, par des délétions ménagées du gène étudié à partir de son extrémité 3', grâce à l'exonucléase III. Puis, après avoir rendu franches les extrémités délétées, on ajoute la partie codant la forme mature de la β -lactamase. Ainsi, environ 1 clone sur 3 sera en phase, et permettra l'obtention d'une protéine de fusion dont l'activité β -lactamase sera testée selon le principe décrit précédemment.

D'après les auteurs, cette technique peut avantageusement remplacer l'utilisation de la phosphatase alcaline car, d'une part, elle permet d'éliminer toutes les fusions qui ne sont pas en phase et d'autre part, elle base la discrimination de la localisation de l'enzyme à partir d'un phénotype qualitatif et non plus quantitatif.

c) L'accessibilité aux protéases et les fusions avec la β -galactosidase

Depuis très longtemps, des fusions avec la β -galactosidase sont utilisées pour étudier l'expression d'un gène dont on ne peut pas facilement repérer le produit. Il n'est donc pas étonnant de constater que des expériences de fusion de protéines ont été tentées avec des protéines membranaires, d'autant plus qu'il existe, comme pour la phosphatase alcaline, un transposon, *TnlacZ* (Manoil, 1990). Cependant ces tentatives se sont révélées partiellement infructueuses car la β -galactosidase ne peut pas traverser la membrane cytoplasmique. Dans certains cas, ce type de tentative aboutit à la létalité de la cellule, et dans d'autres, lorsque l'environnement n'est pas

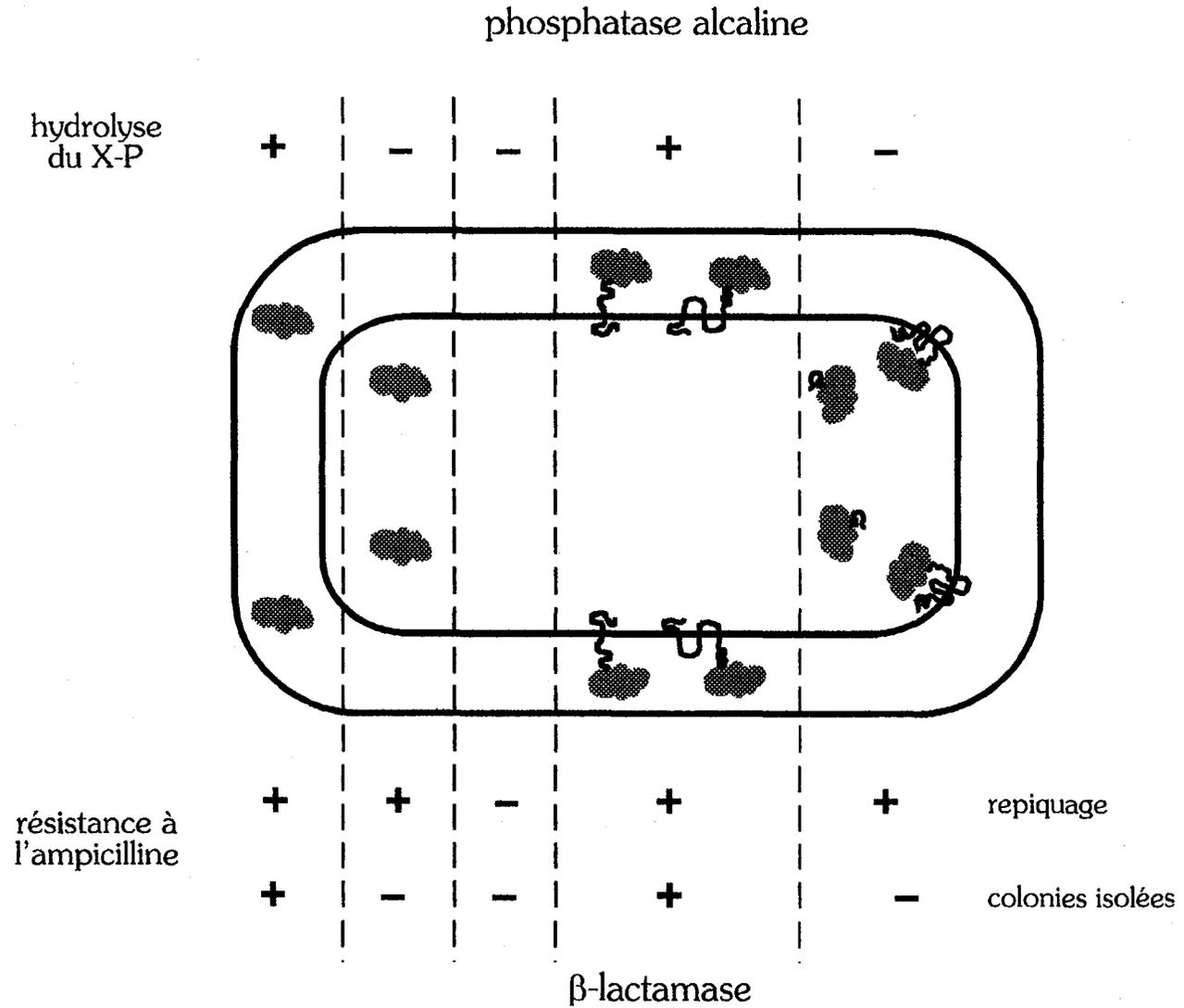


Figure 29 : Comparaison des phénotypes des différents cas de fusion de protéines avec la phosphatase alcaline ou la β-lactamase

défavorable, on peut observer une activité. Donc, la β -galactosidase reste une enzyme qui ne permet que l'identification des régions cytoplasmiques, et c'est pourquoi elle est souvent associée à des fusions avec la phosphatase alcaline (Schülein et coll., 1992, Buhr et Erni, 1993).

La technique d'accessibilité aux protéases ne peut être employée que lorsque l'on peut radiomarquer les protéines exprimées à partir d'un plasmide, ou lorsque l'on possède des anticorps dirigés contre la protéine étudiée. Ainsi une faible quantité de cellules suffit à la préparation de sphéropastes qui permettent d'exposer les régions périplasmiques à des protéases (la plus utilisée étant la protéinase K). On peut aussi préparer des vésicules inversées et soumettre ainsi les régions cytoplasmiques à l'action de protéases. Les fragments digérés sont alors séparés sur un gel de polyacrylamide et leurs tailles sont déterminées. Cette méthode est très peu employée seule. On la retrouve souvent en complément de fusions obtenues avec la phosphatase alcaline ou la β -lactamase (Pearce et coll., 1992, Vianney et coll. 1994, Whitley et coll., 1994).

Aujourd'hui la technique de fusion de gènes est de plus en plus couramment employée pour déterminer la topographie des protéines membranaires. Mais elle est aussi utilisée comme outil dans les études tentant de définir les paramètres qui sont impliqués dans le processus de l'insertion et de l'orientation des segments dans la membrane (Mac Govern et coll., 1991, Uhland et coll., 1994, Gafvelin et von Heijne, 1994).

3°) LES METHODES PHYSIQUES

a) La résonance magnétique nucléaire

Cette technique nécessite une parfaite purification en grande quantité (10 à 100 mg) de la protéine dont on veut connaître la structure tridimensionnelle. La protéine est placée en solution dans un champ magnétique, et la réponse des différents atomes à ce champ magnétique varie en fonction de leur environnement. Cette méthode est donc très fine puisqu'elle fournit des renseignements au niveau atomique. Aujourd'hui, elle ne peut pas permettre l'analyse de protéines de plus de 200 résidus, à cause d'une limitation de la puissance des calculateurs nécessaires à l'intégration et la corrélation de toutes les réponses. De plus, le fait que les protéines soient en solution implique que la flexibilité de la chaîne polypeptidique est conservée, ce qui conduit à l'établissement de plusieurs conformations possibles (toutes très proches les unes des autres). La résonance magnétique nucléaire permet donc de déterminer l'organisation spatiale de peptides et de petites protéines, en attendant que les développements techniques et informatiques puissent lui permettre de traiter des protéines de taille plus importante (Lever et coll., 1994).

b) La diffraction aux rayons X

Il s'agit de la méthode qui aujourd'hui est considérée comme la référence permettant de visualiser l'organisation spatiale de la protéine, et ceci quelle que soit sa taille. Mais une fois de plus, la parfaite purification de la protéine en grande quantité est absolument nécessaire à une bonne cristallisation. De plus, cette cristallisation doit préserver la structure biologiquement active de la protéine. En ce qui concerne la cristallisation des protéines membranaires, l'utilisation de détergents de petite taille semble être la solution la plus fructueuse (Michel, 1983). Il faut aussi signaler que des cristaux de protéines membranaires à deux dimensions, sont plus facilement obtenus que des cristaux à trois dimensions, en raison de leur caractère moins hydrophobe (Deisenhofer et Michel, 1989). Ils sont de taille plus faible, de degré d'organisation moins élevé, et donc ne permettent pas une très haute résolution. Cependant, les informations obtenues sur l'organisation structurale de la protéine peuvent se révéler indispensable à la préparation de cristaux de trois dimensions. Ces derniers sont incontournables pour déterminer une structure en haute résolution.

Dans ces deux dernières approches, le nombre des protéines membranaires étudiées reste extrêmement faible. En effet, le problème de la purification de celles-ci, en respectant leur conformation *in vivo*, est très singulier. Aujourd'hui encore, on ne peut qu'essayer différents détergents en prenant garde que ceux-ci n'interfèrent pas avec l'activité de la protéine, qui demeure, généralement, le seul témoin du maintien de la conformation active.

4°) LES METHODES DE PREDICTIONS DE STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES

Grâce à la cristallisation des protéines, il est possible de connaître exactement l'organisation spatiale des différents acides aminés les uns par rapport aux autres. Ceci a permis de classer les protéines en différentes catégories conformationnelles, suivant la prédominance du type d'organisation : on parle du « tout α », « tout β », ou « α / β ». Ces différentes données structurales constituent une banque de données, dans laquelle on peut rechercher si la séquence d'acides aminés de la protéine étudiée peut adopter une structure proche de celle d'une autre protéine. La comparaison est exprimée sous la forme d'un score. En comparant celui-ci avec le meilleur score existant dans la banque, on peut estimer le degré de fiabilité de la prédiction.

En ce qui concerne les protéines membranaires, le nombre des structures disponibles dans la banque de données est bien trop faible pour que l'on puisse aboutir à un résultat significatif. Cependant, on peut exploiter les résultats obtenus par la cristallisation du centre de réaction photosynthétique de *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer et coll., 1985). Cette exploitation peut permettre de prédire l'orientation des différents segments les uns par rapport aux autres. Cette

prédiction est basée sur le fait que certains acides aminés sont souvent retrouvés à l'intérieur d'un segment, alors que d'autres sont majoritairement exposés à l'extérieur, c'est à dire en contact avec la membrane, d'autres encore sont souvent impliqués dans des relations entre plusieurs segments. Ainsi, il aujourd'hui possible de prédire que tel ou tel segment, supposé membranaire, possède des caractéristiques favorables ou défavorables à son insertion dans la membrane, et même s'il peut participer ou non à des interactions avec d'autres segments. Cependant, ces prédictions ne s'effectuant qu'à partir d'un nombre limité de segments, il faut reconnaître que ces prédictions sont peu fiables lorsque la composition en acides aminés est très différente de celles prises en référence.

B) REALISATION DE LA TOPOGRAPHIE DE LA PROTEINE MdoH

1°) LOCALISATION DE LA PROTEINE MdoH DANS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

a) Construction de trois fusions ciblées avec la β -lactamase

Afin de prouver la localisation membranaire de MdoH, nous avons décidé de construire des protéines de fusion avec la partie mature de la β -lactamase. En premier lieu, j'ai choisi trois sites de restriction dans la séquence de *mdoH*, qui devaient me permettre d'obtenir au moins une fusion conduisant à la localisation périplasmique de la partie β -lactamase. Par la même occasion, je pouvais vérifier que de telles fusions pouvaient correctement s'exprimer, ce qui apparaissait nécessaire avant d'envisager une étude complète de la topographie de MdoH par la technique décrite par Broome-Smith et coll. (1990).

La première fusion a été effectuée au niveau du site de restriction *EcoRV* (coordonnée 0,1 kb, sur la Figure 30, page 84). Le fragment *PvuII-EcoRI* de pYZ5 (Figure 31, page 86), contenant le gène *blaM* tronqué, a été inséré dans le plasmide pNF309, préalablement coupé par les enzymes *EcoRV* et *EcoRI*. La deuxième fusion a été réalisée au niveau du site de restriction *SmaI* (coordonnée 1,42 kb sur la Figure 30, page 84). Le fragment *BamHI-SmaI* de pNF309, contenant la région 5' du gène *mdoH*, a été inséré dans le plasmide pNF150 (Figure 31, page 86), préalablement coupé par les enzymes *BamHI* et *EcoRV*. La troisième fusion a été réalisée au niveau du site *SphI* (coordonnée 1,62 sur la Figure 30, page 84). Le fragment *BamHI-SphI* de pNF309, contenant la région 5' du gène *mdoH*, a été inséré dans le plasmide pNF150, préalablement coupé par les enzymes *BamHI* et *SphI*. Les protéines de fusion ainsi construites ont permis d'identifier l'existence d'au moins un segment transmembranaire, puisque la fusion au niveau du site *SmaI* (correspondant au 470ème acide aminé) révèle un phénotype cytoplasmique, et qu'une fusion au niveau du site *SphI* (correspondant au 541ème acide aminé) révèle un phénotype périplasmique. D'autre part, la fusion au niveau du site *EcoRV* (correspondant au 25ème acide aminé), révélant un phénotype

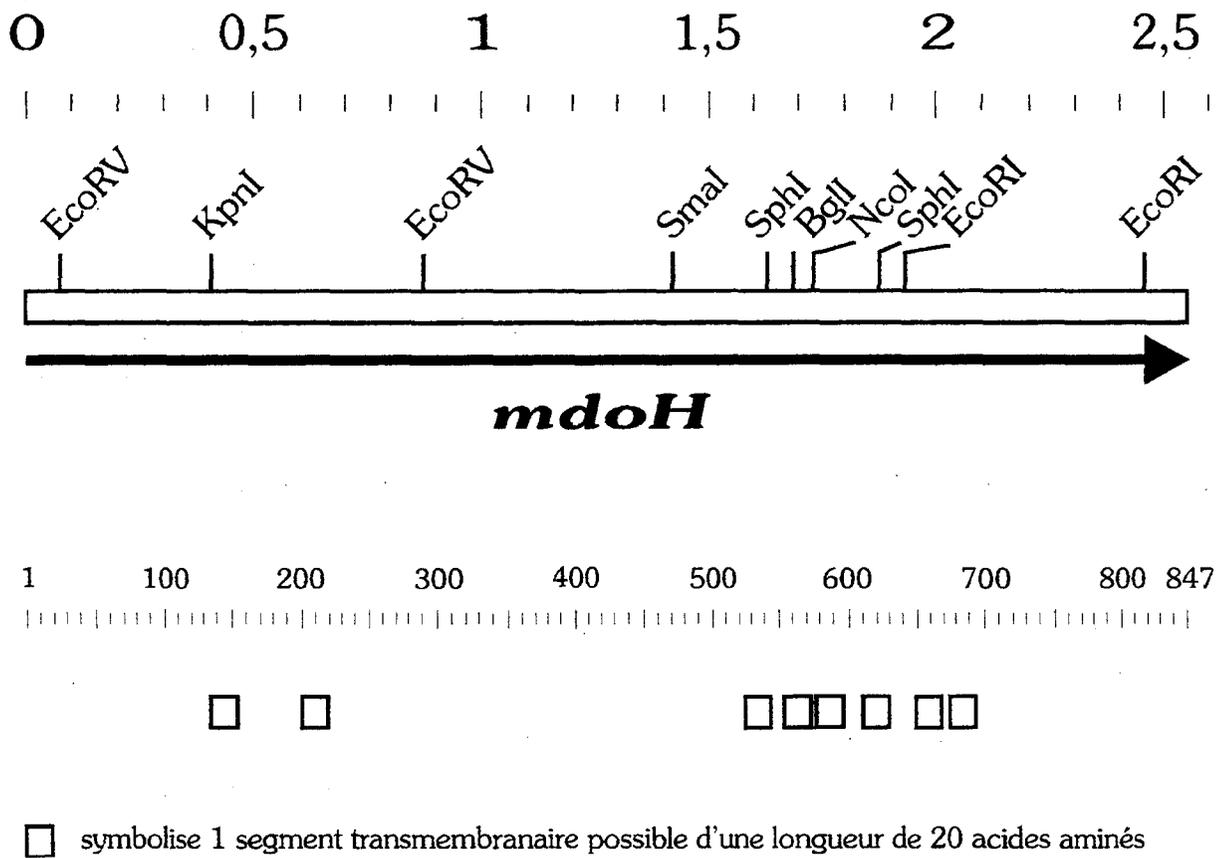


Figure 30 : Représentation schématique :
 de la région codante du gène *mdoH* (l'échelle est en kilobase)
 de la séquence en acides aminés (l'échelle est en nombre d'acides aminés)

cytoplasmique, nous permettait de confirmer que la partie aminée de MdoH était localisée dans le cytoplasme.

b) Localisation des trois protéines de fusion

L'activité β -lactamase des souches exprimant les trois protéines de fusion a été déterminée (voir fiche technique N°4). Les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous, permettent de conclure à la localisation cytoplasmique de la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé 25, et à la localisation membranaire des deux autres protéines de fusion.

site de la fusion	activité β -lactamase (unités arbitraires)		
	surageant	culot	total
AA N°25	116,4 (98,6%)	1,6 (1,4%)	118
AA N°470	7,9 (22,4%)	27,4 (77,6%)	35,3
AA N°541	15,3 (47,4%)	17,0 (52,6%)	32,3

Ainsi, la localisation membranaire de MdoH était démontrée, et l'expression correcte des protéines de fusion pouvait nous permettre d'envisager l'étude précise de la topographie de MdoH en employant la méthode de fusions aléatoires avec la β -lactamase. Cette étude avait pour but de mieux distinguer les régions de MdoH exposées dans le périplasme, et qui pourraient être impliquées dans une activité ou des interactions protéine-protéine, et les régions situées dans le cytoplasme, responsables de la reconnaissance de l'UDP-glucose conduisant à la biosynthèse des chaînes de polyglucose.

2°) CONSTRUCTION DE FUSIONS ALEATOIRES AVEC LA β -LACTAMASE

a) Réalisation des fusions aléatoires

La méthode décrite par Broome-Smith consiste à effectuer des délétions ménagées de *mdoH*, cloné dans pYZ4, avec l'exonucléase III. Ensuite, il faut y adjoindre '*blaM*', la version tronquée du gène *blaM*, codant la partie mature de la β -lactamase et provenant du plasmide pYZ5. L'orientation de '*blaM*' doit s'effectuer par le site de restriction *EcoRI*. Malheureusement, le gène *mdoH* contient deux sites *EcoRI*. Nous avons donc contourner cette difficulté en construisant un nouveau plasmide, dérivé de pYZ4, qui contient déjà '*blaM*'. Ce plasmide, appelé pNF150, permet d'obtenir '*blaM*' en aval du multisite de clonage de pYZ4 (Figure 31, page 86). Il se révèle être un outil plus efficace pour effectuer des fusions aléatoires, car on supprime l'étape d'adjonction de '*blaM*'. De plus, il permet de réaliser, grâce à la présence du multisite de clonage, des fusions avec '*blaM*' dans les trois

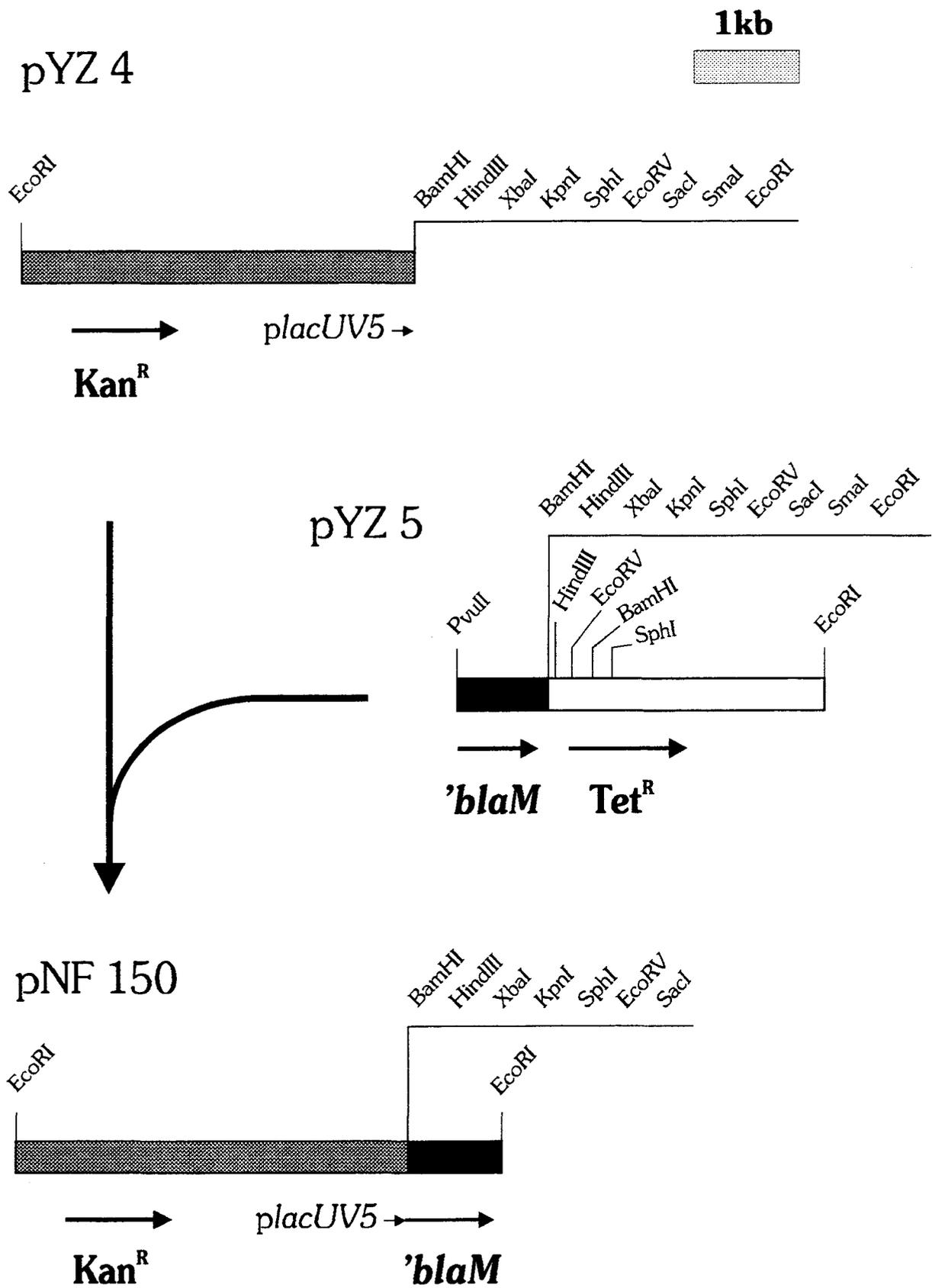


Figure 31 : Carte des plasmides ayant permis la construction du vecteur pNF150. Celui-ci permet l'expression d'une β -lactamase cytoplasmique qui confère une résistance à l'ampicilline, uniquement lorsque les bactéries sont repiquées.

cadres de lecture possibles. Il faut noter que ce plasmide présente une fusion de gène *lacZ-blam* qui permet l'expression d'une protéine hybride ayant une activité β -lactamase cytoplasmique, ce qui permet aux cellules de résister à l'ampicilline, uniquement lors de repiquages.

Le fragment *Bam*HI-*Bam*HI de pNF309, contenant le gène *mdoH*, a été introduit dans le plasmide pNF150 linéarisé par l'enzyme *Bam*HI. Ce plasmide, possédant alors le gène *mdoH* sous le contrôle du promoteur *placUV5*, se nomme pNF318 (Figure 19, page 56). Il m'a permis d'obtenir un grand nombre de fusions réparties tout le long de la séquence de MdoH. Cependant, je n'ai jamais obtenu dans *mdoH* de fusion plus courte que celle obtenue par le clonage au site *Eco*RV, bien que je sois arrivé à en obtenir quelques-unes situées à la fin de la partie codante de *mdoG*. Je n'ai pas non plus obtenu de fusions entre les acides aminés 140 et 256 à partir du plasmide pNF318. Afin d'obtenir des fusions dans cette région, j'ai construit un nouveau plasmide en clonant une version tronquée de *mdoH* (fragment *Bam*HI-*Bcl*I de pNF309, correspondant au fragment *Mlu*I-*Bcl*I de coordonnées 3,9-4,9 kb sur la Figure 11, page 44) dans le plasmide pNF150 (préalablement coupé par *Bam*HI). Ce nouveau plasmide, appelé pNF401, m'a permis d'effectuer de nouvelles délétions qui ont conduit à l'obtention de nouvelles fusions entre les acides aminés 140 et 256.

Ainsi un total de 51 fusions indépendantes ont été séquencées afin de déterminer la position exacte des différents points de fusion (Tableau IV, page 88, 89 et 90).

b) Détermination des concentrations minimales inhibitrices à l'ampicilline

Toutes les fusions qui permettent la croissance en colonies isolées après épuisement, sont toutes capables de provoquer la résistance à des concentrations d'ampicilline supérieures à 80 μ g/ml (Tableau V, page 91). Par contre, toutes les fusions qui ne permettent pas la formation de colonies isolées après épuisement, donnent des niveaux de résistance assez différents les uns des autres mais toujours inférieur à 80 μ g/ml. Il faut souligner que la souche NFB216 (réceptrice de tous les plasmides de fusion) ne peut pas croître au delà d'une concentration en ampicilline de 4 μ g/ml. Les différentes valeurs de concentration minimale inhibitrice, parmi les fusions cytoplasmiques et périplasmiques, peut s'expliquer, soit par l'adoption d'une conformation défavorable à l'activité β -lactamase, soit par une différence de stabilité des protéines hybrides. En effet, il a été montré que certaines protéines fusions pouvaient être instables et rapidement dégradées (Zhang et Broome-Smith, 1990, Calamia et Manoil, 1990).

D'après les capacités de chaque fusion à former des colonies isolées, il apparaît clairement que MdoH contient 8 segments transmembranaires. Ceci permet la mise en évidence que l'extrémité aminée, la partie centrale et l'extrémité carboxylique sont situées dans le cytoplasme, et qu'il n'existe pas de grandes régions exposées dans le périplasma.

POSITION DES
POINTS DE FUSION

SEQUENCES DES POINTS DE FUSIONS *mdoH-blaM*
EN ACIDES AMINES ET EN NUCLEOTIDES

AA N°25 a	K T D L R H
(2017) b	AAG ACT GAT * CTG CGT CAC
AA N°33	Q A L V K V K
(2041)	CAG GCG CTG G*TG AAA GTA AAA
AA N°44	R E D A L R H
(2074)	CGG GAG GAT G*CC CTG CGT CAC
AA N°61	W P D S P L R
(2185)	TGG CCA GAT TC*T CCC CTG CGT
AA N°75	E G R V K V K
(2167)	GAA GGG CGC G*TG AAA GTA AAA
AA N°87	K R S S P L R
(2203)	AAA CGC TCC TC*T CCC CTG CGT
AA N°129	E Q K S P L R
(2329)	GAG CAA AAG T*CT CCC CTG CGT
AA N°140	R Y I P E T L
(2362)	CGT TAC ATT C*CA GAA ACG CTG
AA N°166	G W A R H P E
(2442)	GGT TGG GCG C*GT CAC CCA GAA
AA N°175	M V G H P E T
(2476)	ATG GTT GGT CA*C CCA GAA ACG
AA N°256	D V N P P L R
(2710)	GAC GTG AAC C*CT CCC CTG CGT
AA N°260	V F A P L R
(2722)	GTT TTT GCT * CCC CTG CGT
AA N°263	G L R H P E
(2731)	GGC CTG CGT * CAC CCA GAA
AA N°298	Q K A L R H
(2836)	CAA AAA GCC * CTG CGT CAC
AA N°317	R R R L R H
(2893)	CGC CGC CGC C*TG CGT CAC CCA
AA N°354	T G D P L R
(3004)	ACC GGT GAT * CCC CTG CGT
AA N°356	D C L S L R H
(3010)	GAT TGT TTG T*CC CTG CGT CAC
AA N°366	E A N P E T L
(3040)	GAA GCC AAC CC*A GAA ACG CTG
AA N°376	S S P T P L R
(3070)	TCG TCG CCG A*CT CCC CTG CGT
AA N°386	L Y A P L R
(3100)	CTG TAT GCG * CCC CTG CGT
AA N°403	T A G S P L R
(3151)	ACA GCC GGT T*CT CCC CTG CGT
AA N°407	H F W Q R H P
(3163)	CAC TTC TGG CA*C CGT CAC CCA

AA N° 421 (3205)	A I I P L R H GCG ATT ATC C*CC CTG CGT CAC
AA N° 433 (3241)	A L A P L R H GCA CTG GCT CC*C CTG CGT CAC
AA N° 439 (3259)	G E G S P L R GGC GAA GGT TC*T CCC CTG CGT
AA N° 451 (3295)	D F V A P L R GAC TTC GTG G*CT CCC CTG CGT
AA N° 465 (3337)	V W I A E T L GTC TGG ATT GC*A GAA ACG CTG
AA N° 469 (3349)	Y D L P S S S TAC GAT CTC CC*A TCG AGC TCT
AA N° 474 (3364)	S Y E A P L R TCT TAT GAA G*CT CCC CTG CGT
AA N° 498 (3436)	M N F P L R H ATG AAC TTC C*CC CTG CGT CAC
AA N° 516 (3490)	F L T A L R H TTC CTG ACG G*CC CTG CGT CAC
AA N° 519 (3499)	G V M P L R GGC GTG ATG * CCC CTG CGT
AA N° 525 (3517)	S A P P L R H TCC GCT CCG C*CC CTG CGT CAC
AA N° 542 (3568)	V H A I S S GTG CAT GCG * ATA TCG AGC
AA N° 549 (3589)	Q Y F P P L R CAA TAC TTC C*CT CCC CTG CGT
AA N° 563 (3631)	Q W R H P E T CAG TGG CGT C*AC CCA GAA ACG
AA N° 573 (3661)	F A S T L V K TTT GCT TCG AC*G CTG GTG AAA
AA N° 579 (3679)	L L F R H P E CTG TTG TTC C*GT CAC CCA GAA
AA N° 584 (3694)	K L L P L R AAG TTA TTG * CCC CTG CGT
AA N° 606 (3760)	T L S S L V K ACA TTA TCG T*CG CTG GTG AAA
AA N° 623 (3811)	R M L R H P CGC ATG CTG * CGT CAC CCA
AA N° 645 (3875)	P Q R H P E CCG CAG CGT * CAC CCA GAA
AA N° 660 (3922)	R H G S P L R CGC CAC GGC TC*T CCC CTG CGT
AA N° 670 (3952)	V W A P L R GTG TGG GCT * CCC CTG CGT

AA N° 694 (4024)	I	L	S	H	P	E	T
	ATC	CTG	TCA	C*AC	CCA	GAA	ACG
AA N° 708 (4066)	V	G	L	R	H	P	E
	GTT	GGT	CTG	CG*T	CAC	CCA	GAA
AA N° 728 (4126)	Q	V	L	V	K	V	K
	CAG	GTG	CTG	GT*G	AAA	GTA	AAA
AA N° 765 (4237)	M	A	T	V	R	H	P
	ATG	GCG	ACC	G*TG	CGT	CAC	CCA
AA N° 768 (4246)	A	R	H	P	E	T	L
	GCG	CGT	CAC	C*CA	GAA	ACG	CTG
AA N° 790 (4312)	E	T	P	E	T	L	V
	GAG	ACG	CCA	GA*A	ACG	CTG	GTG
AA N° 833 (4441)	G	I	K	P	L	R	H
	GGG	ATA	AAG	C*CC	CTG	CGT	CAC

Tableau IV : Positions et séquences des points de fusion de *mdoH-blaM*.

Les symboles * indiquent exactement la position du point de fusion.

Les acides aminés en gras sont des acides aminés hybrides.

^a : Ces numéros correspondent à la position du dernier acide aminé de MdoH.

^b : Ces nombres indiquent la position du premier nucléotide inscrit sur la ligne. Le nucléotide de coordonnée 1 correspond au premier nucléotide du site *SspI* de coordonnée 2,2 kb sur la figure 11 (page&).

Tableau V : Liste de la position des différentes protéines de fusion.

<i>position en nucléotide</i>	<i>n° acide aminé</i>	<i>cfc</i>	<i>cmi</i>	<i>position en nucléotide</i>	<i>n° acide aminé</i>	<i>cfc</i>	<i>cmi</i>
2025	25	-	8	3347	465	-	
2050	33	-		3359	469	-	8
2083	44	-		3373	474	-	
2135	61	-		3445	498	-	
2176	75	-		3499	516	-	
2213	87	-	8	3507	519	-	8
2338	129	-		3526	525	+	>200
2371	140	-	8	3576	542	+	
2442	166	+	>200	3598	549	+	>200
2476	175	+	>200	3640	563	+	>200
2719	256	-	8	3671	573	+	
2730	260	-		3688	579	+	
2739	263	-		3702	584	+	>100
2844	298	-		3769	606	-	8
2902	317	-		3819	623	-	<40
3012	354	-	8	3885	645	+	>80
3019	356	-		3932	660	-	<80
3050	366	-		3960	670	-	>10
3079	376	-		4033	694	+	200
3108	386	-		4076	708	+	>80
3160	403	-		4136	728	-	8
3173	407	-		4246	765	-	
3214	421	-		4255	768	-	
3251	433	-		4322	790	-	
3269	439	-		4450	833 ^a	-	8
3304	451	-					

nucléotide : position du dernier nucléotide de *mdoH* (le nucléotide de coordonnée 1 correspond au 1er nucléotide du site *SspI* de coordonnée 2,2 kb sur la figure &)

acide aminé : position du dernier acide aminé de MdoH.

cfc : capacité à former des colonies isolées sur LB plus ampicilline à 50 µg/ml

cmi : concentration minimale inhibitrice en µg/ml d'ampicilline.

^a : protéine fusion permettant le rétablissement de la biosynthèse du MDO à un niveau comparable à celui obtenu à partir du plasmide pNF309.

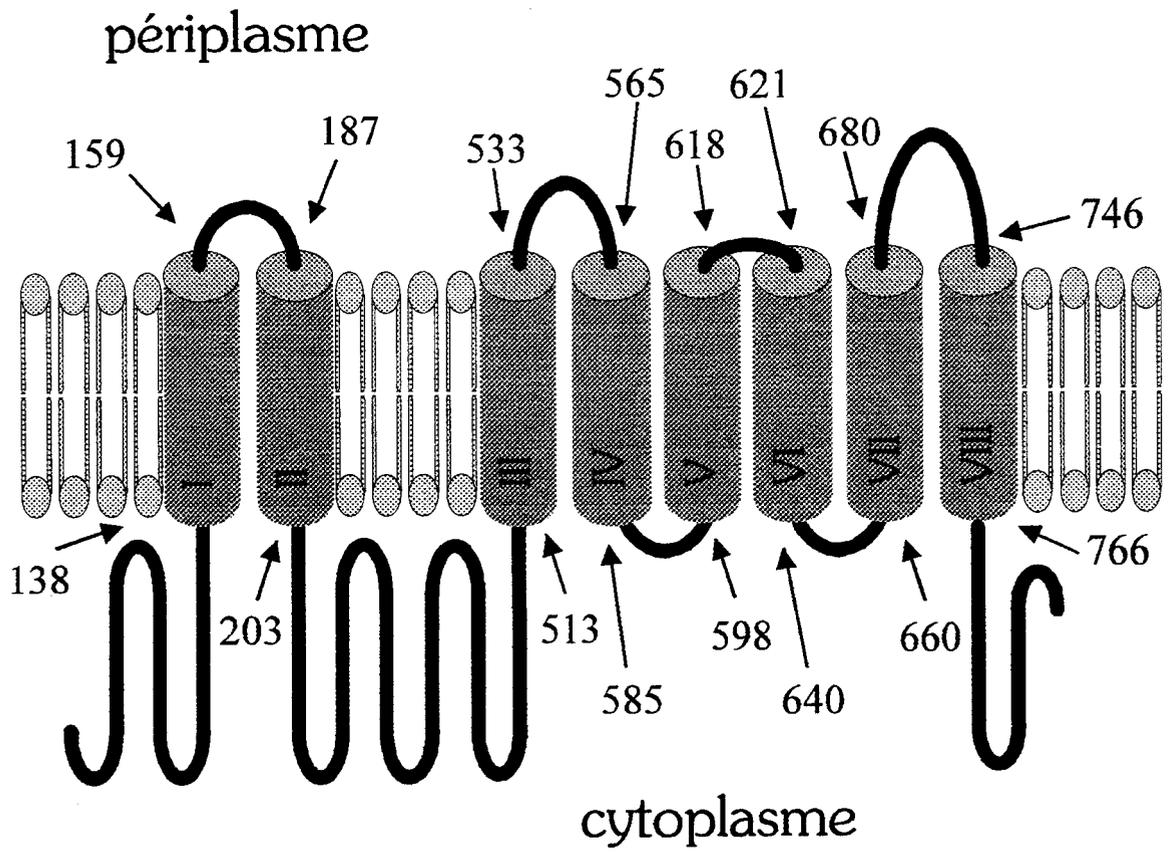


Figure 32 : Modèle topographique simplifié de MdoH, établi uniquement à partir du résultat des protéines de fusion

3°) ETABLISSEMENT DU MODELE DE LA TOPOGRAPHIE DE MdoH

Le positionnement des différents points de fusion le long de la séquence d'acides aminés, corrélé aux données d'hydrophobie et de prédiction de la structure secondaire, nous permet de construire un modèle précisant la position des 8 segments transmembranaires (Figure 32). Toutefois, il restait une incertitude au niveau du segment VIII. En effet, les fusions 694 et 708 sont périplasmiques, et les fusions 728, 760, 790 et 833 sont cytoplasmiques. Il conviendrait donc d'en déduire qu'il existe un segment transmembranaire entre les positions 708 et 728. Or, dans cette région il n'existe que 6 acides aminés consécutifs prédits sous forme hélicale, et 4 résidus hydrophobes consécutifs. Ces caractéristiques ne sont pas suffisantes à la formation d'un segment transmembranaire. Par contre, entre les résidus 746 et 766, il existe une majorité d'acides aminés moyennement hydrophobes, et 11 résidus consécutifs prédits sous forme hélicale. Cette région (746-766) serait donc le meilleur candidat, pour former le 8ème segment transmembranaire. Cette solution impliquerait que le phénotype cytoplasmique de la fusion 728 serait dû à une faible expression de la protéine de fusion.

4°) LE ROLE DES ACIDES AMINES CHARGES POUR CONFIRMER LA TOPOGRAPHIE.

A la suite de la mise en évidence du rôle des acides aminés chargés dans l'établissement de la topographie des protéines membranaires (von Heijne, 1986, Boyd et Beckwith, 1989, Nilsson et von Heijne, 1990), von Heijne, en 1992, a établi une règle dénommée : « positive inside rule » (règle des positifs à l'intérieur). Cette règle stipule que le nombre des acides aminés chargés positivement est plus important au voisinage de la face cytoplasmique de la membrane cellulaire, qu'au voisinage de sa face périplasmique.

La répartition des acides aminés chargés de MdoH, appliquée au modèle proposé sur la figure 32, montre que tous les segments, à l'exception du numéro VIII, sont délimités par une répartition d'acides aminés qui respecte la règle de von Heijne. Contrairement aux autres, la position du segment VIII implique la présence d'un grand nombre de résidus chargés positivement dans le périplasme. A partir de cette constatation, il m'est apparu que la position des fusions 690 et 708, provoquait une disparition de la plupart des résidus positifs de cette région. Il est donc fort probable que la disparition de ce nombre important de charges empêchent la stabilisation d'un segment transmembranaire. Ainsi, les fusions 690 et 708 ne seraient périplasmiques qu'à cause d'un défaut d'insertion. Ceci impliquerait donc que le segment VIII, qu'on pouvait envisagé aux positions 746 à 766, serait en fait positionné au niveau des acides aminés 680 à 700, ce qui correspondrait à une région plus hydrophobe et ayant une prédiction de structure sous forme d'hélice α plus importante, que la région des acides aminés 746 à 766. Le repositionnement du segment VIII aboutit ainsi à une

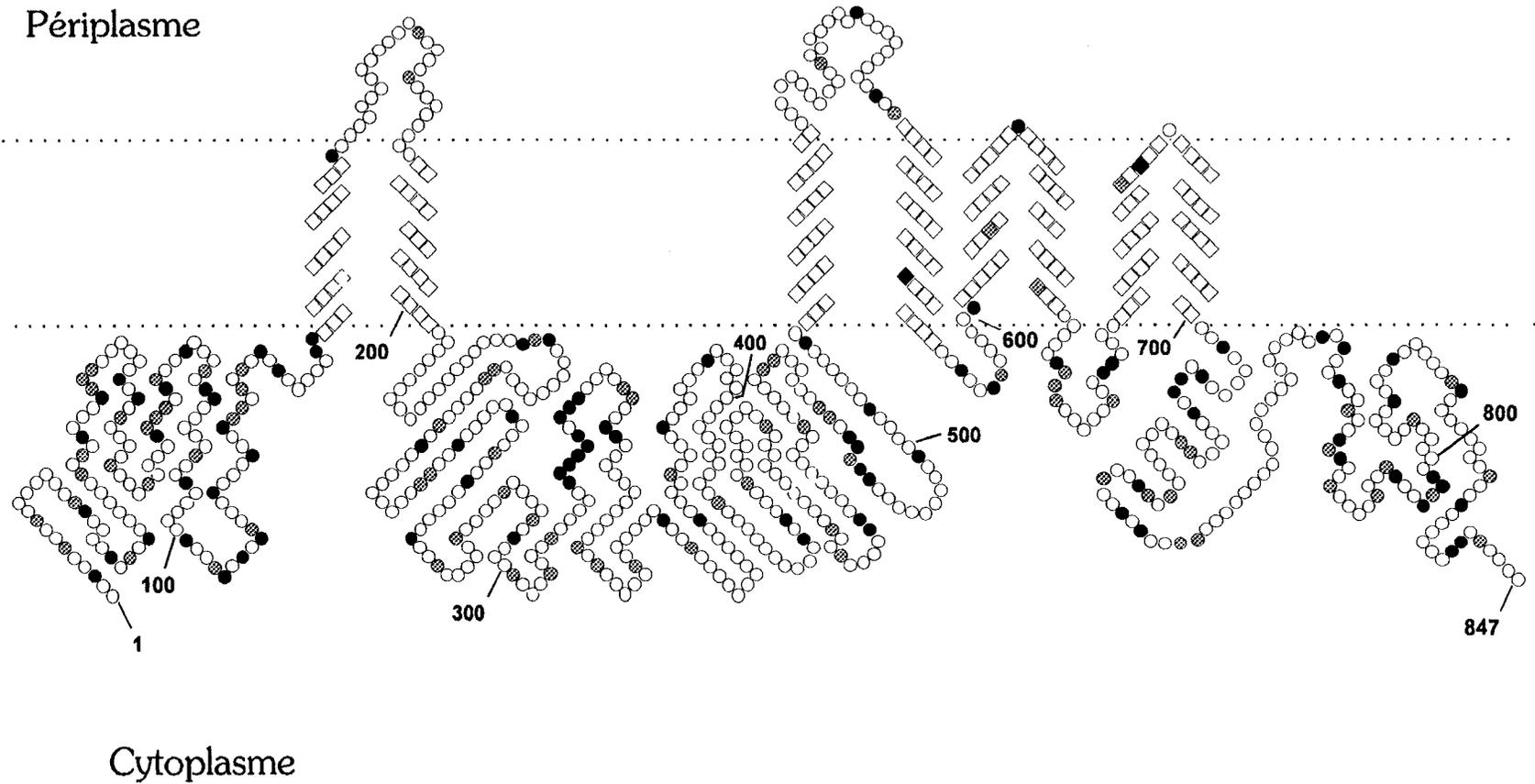


Figure 33 : Modèle topographique de MdoH établi à partir du résultat des protéines de fusion et du respect de la répartition des charges
 La couleur noire symbolise les positions des acides aminés arginine et lysine
 La couleur grise symbolise les positions des acides aspartiques et glutamiques
 Les carrés symbolisent les acides aminés impliqués dans la formation d'un segment transmembranaire

répartition des acides aminés chargés qui est nettement plus en accord avec la règle de von Heijne (Figure 33). Un tel cas a déjà été rencontré (von Heijne, 1992), et depuis l'établissement de cette règle, des expériences ont montré que la suppression de charges positives situées à l'extrémité cytoplasmique d'un segment transmembranaire, conduisait à sa suppression, voir même à une inversion de son orientation (Gafvelin et von Heijne, 1994, Kimbrough et Manoil, 1994).

5°) LE MODELE TOPOGRAPHIQUE DEFINITIF

La confrontation des résultats obtenus par les prédictions, les fusions de gènes et le respect de la répartition des charges, nous permettent d'établir le modèle topographique de la protéine MdoH présenté sur la figure 34 (page 96). Cette protéine est ancrée dans la membrane par 8 segments transmembranaires qui déterminent la localisation cytoplasmique des extrémités aminée et carboxylique, ainsi que d'une très grande région centrale (310 acides aminés). Il n'existe donc que deux régions périplasmiques consécutives d'une longueur de 28 et 32 acides aminés.

Le modèle établi fait apparaître des segments transmembranaires d'une longueur variable de 18 à 23 résidus. Certaines fusions sont positionnées à l'intérieur de ces segments, et on remarquera tout particulièrement la différence de phénotype entre les fusions 519 et 525. En effet, il a déjà été montré que 9 à 11 résidus sont capables de former un segment suffisant au passage dans le périplasme de la partie repérable de la protéine de fusion (Calamia et Manoil, 1990). Par contre, il n'a jamais été démontré qu'une série de 9 à 11 résidus suffisait à permettre l'organisation correcte d'une protéine dans la membrane cytoplasmique.

Enfin, on peut s'étonner du phénotype donné par les deux protéines de fusion qui borne le 6ème segment transmembranaire : phénotype cytoplasmique pour la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé N°623, et phénotype périplasmique pour la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé N°645. Quand on regarde de plus près la séquence du point de fusion en acides aminés, on s'aperçoit que pour la fusion 623 on obtient la séquence suivante : ${}_{621}\text{R M L R H P}$, à la place de la séquence : ${}_{621}\text{R M L F H T}$. On ajoute donc un deuxième résidu arginine qui devrait être localisé dans le périplasme. Outre le fait que la localisation périplasmique de cette région « positive » va à l'encontre de la « positive inside rule », il a été démontré, très récemment, que l'augmentation du nombre de charges positives, aux abords d'un segment transmembranaire, pouvait empêcher celui-ci de s'insérer dans la membrane (Cao et coll., 1995). Ainsi, la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé 623 ne pourrait pas permettre l'insertion du 5ème segment dans la membrane, à cause de sa séquence particulière en acides aminés. En ce qui concerne la fusion 645, le point de fusion provoque la délétion d'une région où le nombre d'acides aminés chargés est très important. Par contre, la fusion au niveau de l'acide aminé 660 possède encore cette région, et permet l'expression d'un

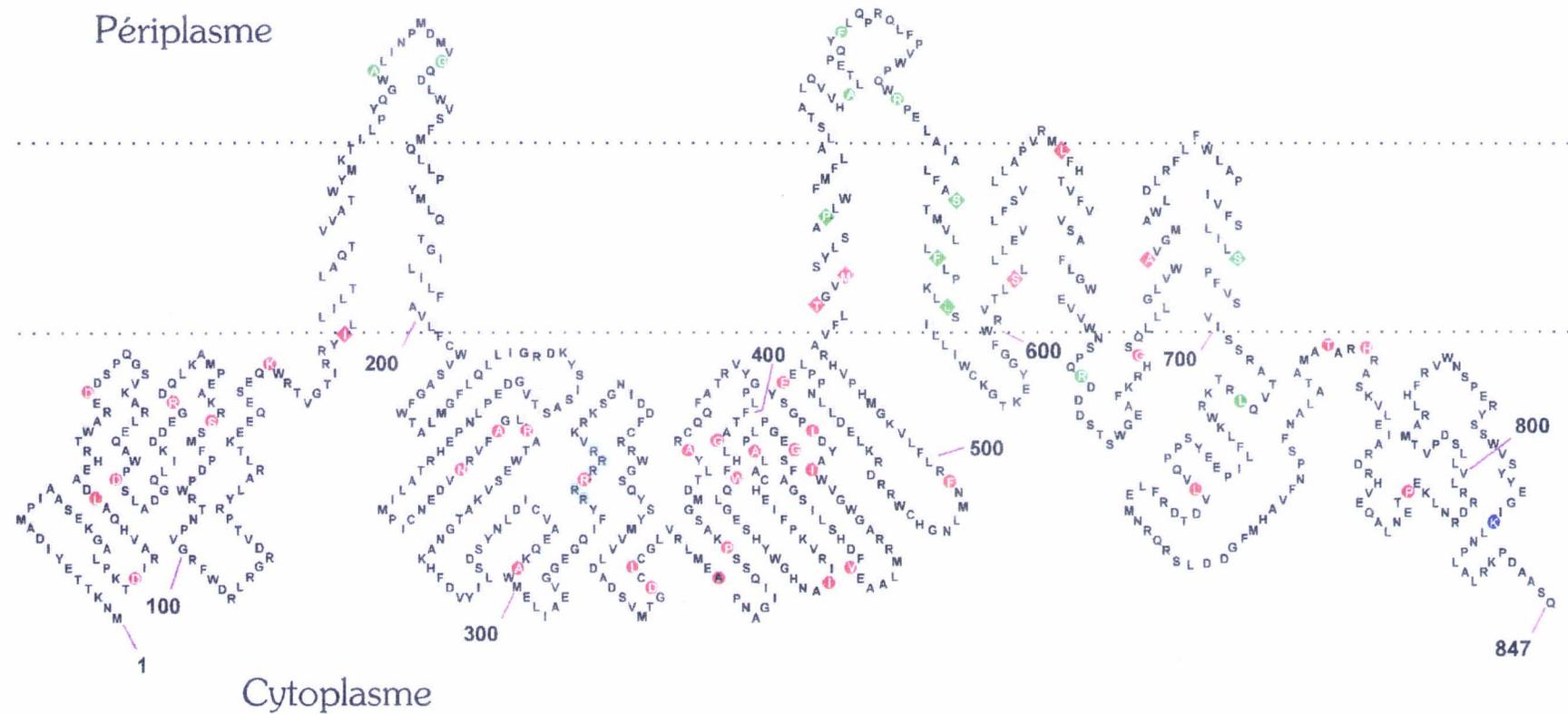


Figure 34 : Modèle topographique définitif de MdoH.

Le couleur verte indique la position des fusions ayant un phénotype périplasmique

La couleur rouge indique la position des fusions ayant un phénotype cytoplasmique

En bleu foncé est soulignée la position de la fusion possédant les deux activités, glucosyltransférase et β -lactamase

En bleu clair sont soulignés les six résidus arginines consécutifs

phénotype cytoplasmique. De ce fait, il apparaît évident que cette région riche en acides aminés chargés est impliquée dans le maintien du 6ème segment. Enfin, le fait que ces deux protéines de fusion particulières influencent la mise en place du 5ème et du 6ème segment, on peut se poser la question suivante : s'agit-il d'une coïncidence ou d'un fait significatif ? Dans ce dernier cas, cela peut nous permettre de dresser une hypothèse selon laquelle ces deux segments pourraient entretenir des interactions qui leur permettraient de se stabiliser.

6°) LA REGION CENTRALE DE MdoH POSSEDE UNE ORGANISATION DE TYPE α/β

La topographie de la protéine MdoH ayant été réalisée, il était intéressant de tenter de mieux connaître l'organisation structurale du grand domaine central. Nous avons donc établi avec une collaboration avec le professeur Gérard Vergoten du CRESIMM (Centre de Recherches et d'Etudes en Simulations et Modélisations Moléculaires). Le travail, effectué par Roman Efremov, a permis d'établir que les acides aminés 218 à 512 pouvaient adopter une conformation de type α/β . Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 35 (page 98). Ce domaine de MdoH possède donc une organisation semblable à d'autres protéines, mais aucune d'entre elles ne présente une activité proche de celle de MdoH. Ces résultats nous permettent toutefois de pouvoir envisager d'effectuer des modifications de la protéine MdoH d'une manière plus dirigée.

De plus, Roman Efremov a tenté d'exploiter les données fournies par notre modèle topographique dans le but de déterminer si les différents segments transmembranaires possédaient des caractéristiques pouvant conduire à des interactions segment-segment. Le résultat de ces recherches fait apparaître que les segments 2, 3, 5 et 8 possèdent des moments hydrophobes importants. Les segments 1, 4 et 7 présentent quant à eux un moment hydrophobe moyen. Enfin, le segment 6 présente une composition en acide aminés trop différente de celles connues jusqu'à présent, pour que l'on puisse considérer le résultat du calcul de son moment hydrophobe comme significatif. Enfin, la répartition des acides aminés des segments 2, 3, et 5, lorsqu'ils sont placés le long d'une hélice α , montre que ces segments présentent une face hydrophobe, et une face hydrophile. Ce type d'observation est relevée chez les segments membranaires qui sont au contact d'une part avec les phospholipides et d'autre part avec un ou plusieurs autres segments.

7°) MESURE DE L'ACTIVITE DE BIOSYNTHESE DU MDO DES PROTEINES DE FUSION

a) Une seule protéine de fusion permet encore la biosynthèse du MDO

Grâce à la construction de multiples fusions de gènes aléatoires, j'ai obtenu une série de délétions de la partie carboxylique de MdoH. Des études identiques menées sur d'autres protéines ont montré qu'il était possible que des protéines de fusion possèdent encore une activité totale ou

Comparaison avec la banque de données THREADER (Jones et coll., 1994) :

Le meilleur score correspond à une homologie structurale avec une carboxypeptidase A du pancréas bovin (N° d'accès 2CTC).

Le deuxième meilleur score correspond à une homologie structurale avec une pentosyltransférase humaine (N° d'accès 1ULA).

Comparaison avec la banque de données PROFIT (Sippl et coll., 1995) :

Le meilleur score correspond à une homologie structurale avec une peroxidase d'*Enterococcus faecalis* (N° d'accès 1NHQ).

Le deuxième meilleur score correspond à une homologie structurale avec la narbonne, protéine de germination des plantes (N° d'accès 1NAR).

Le troisième meilleur score correspond à une homologie structurale avec une aspartate carbamoyltransférase d'*E. coli* (N° d'accès 8ATC).

Figure 35 : Résultats de la comparaison de la prédiction de la structure tridimensionnelle du domaine central de MdoH avec les structures tridimensionnelles des banques de données THREADER et PROFIT. Toutes ces protéines présentent une organisation de type α/β .

partielle (Calamia et Manoil, 1990). C'est pourquoi j'ai testé différentes protéines de fusion vis-à-vis de leur capacité à restaurer la biosynthèse du MDO.

Les résultats de ces dosages sont indiqués dans le tableau VI (page 100). Seule la fusion au niveau de l'acide aminé 833 permet une restauration de la biosynthèse du MDO de manière identique à la souche de référence. Ce résultat nous a quelque peu étonné, car nous espérions tirer plus d'information de ces dosages. Toutefois, il restait possible que la partie β -lactamase de certaines protéines de fusion empêche la mise en évidence de l'activité des protéines tronquées. C'est pourquoi j'ai effectué sur quelques-uns des plasmides de fusion une délétion par l'enzyme de restriction *DraI* qui permet de réduire de 70% la partie codante de la β -lactamase. Ces nouveaux plasmides introduits dans la souche NFB216 n'ont pas permis d'identifier une nouvelle protéine de fusion tronquée possédant une activité suffisante à la restauration de la biosynthèse du MDO (Tableau VI, page 100).

b) L'extrémité carboxylique est directement impliquée dans l'activité de MdoH

A la vue des résultats des dosages MDO précédents, il nous fallait en conclure que l'extrémité carboxylique de la protéine MdoH était impliquée dans une fonction essentielle. Ceci était renforcé par le fait que le plasmide pNF243 ne permettait pas la restauration de la biosynthèse du MDO dans la souche NFB216 (Figure 36, page 100). Ce plasmide a été obtenu après une délétion du fragment *EcoRI* de 0,9 kb du plasmide pNF239 (Lacroix et coll., 1989 ; pNF239 correspond à l'insertion dans pUC8 du fragment *PstI-XhoI* de coordonnées 0-7,5 kb sur la Figure 11, page 44, dans l'orientation plaçant le site *XhoI* immédiatement à côté du site *EcoRI* de pUC8). Afin de déterminer la position de la fin du cadre de lecture de *mdoH*, j'ai effectué le séquençage nucléotidique de cette région. J'ai ainsi vérifié qu'il n'existait qu'un seul nucléotide entre le site *EcoRI* et un codon stop. Ceci signifie que la protéine exprimée à partir du plasmide pNF243 n'est constituée que de 818 résidus.

D'autre part, lors de la construction des fusions aléatoires, j'ai isolé un plasmide qui permettait une restauration partielle de la quantité de MDO (Figure 36, page 100). La séquence du point de fusion de ce plasmide, situé au niveau de l'acide aminé 825, a permis de mettre en évidence que la partie β -lactamase n'était pas en phase avec le gène *mdoH*. La phase de *mdoH* s'arrête ainsi 8 codons après le point de fusion. On obtient donc une protéine tronquée de 833 acides aminés dont les 8 derniers sont différents de la séquence sauvage (Figure 37, page 101).

On peut constater sur la figure 37 (page 101), qu'entre les acides aminés 817 et 833 il y a 7 résidus hydroxylés sur 16. Dans le cas de la protéine tronquée et modifiée, il ne reste plus que 4 acides aminés hydroxylés. Cette différence est peut-être la cause de l'activité partielle de cette protéine. Toutefois, on pouvait aussi penser que les protéines délétées étaient instables et rapidement

souches*	³ H-glycérol (cpm)
pYZ4 / NFB216	400
fusion au 790° AA / NFB216	400
fusion au 790° AA Δ DraI / NFB216	400
codon stop au 818° AA / NFB216	400
codon stop au 833° AA / NFB216	900
codon stop au 833° AA Δ DraI / NFB216	900
fusion au 833° AA / NFB216	6500
fusion au 833° AA Δ DraI / NFB216	6500
JM83	5500

Tableau VI : quantité de MDO produite par l'expression de différentes versions tronquées de la protéine MdoH (voir texte).

* : NFB216 est la dérivée *mdoH200::Tn10* de JM83.

Δ DraI : délétion par l'enzyme *DraI* qui permet d'ôter 70% de la partie β -lactamase.

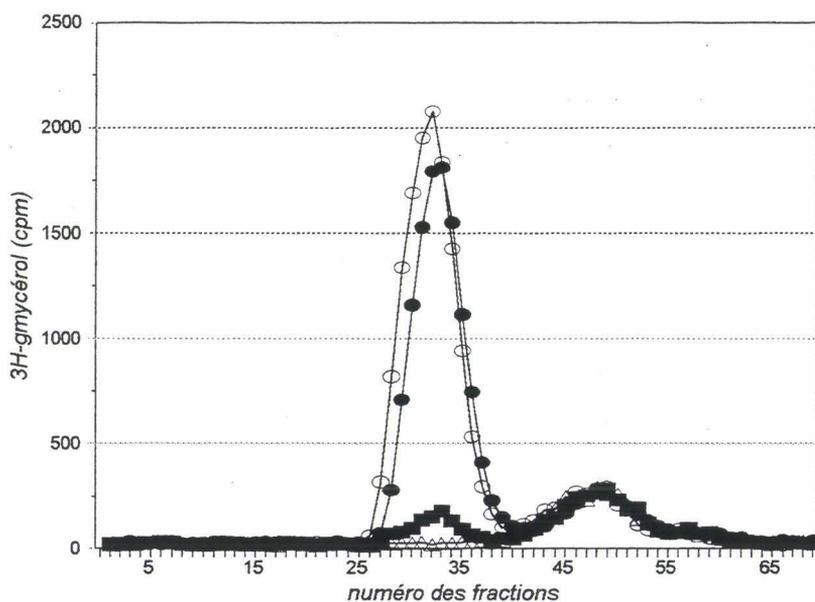


Figure 36 : Chromatographie sur Sephadex G25 des extraits pyridine des souches :

	quantité de MDO / souche sauvage
△ : codon stop au 818° AA / NFB216	0 %
■ : codon stop au 833° AA / NFB216	7,6 %
○ : fusion au 833° AA / NFB216	117 %
● : pYZ4 / JM83	100 %

815 **V W N S P E R Y S S W V S Y Y E G I K L N P L A L R K P D A A S Q** = 847 AA (séquence sauvage)

815 **V W N S P E R Y S S W V S Y Y E G I K P L R** = fusion au niveau de l'acide aminé 833 *mdoH-blaM* active.

815 **V W N S P E R Y S S W P C V T Q K R W** = 833 AA (séquence tronquée)

815 **V W N S** = 818 AA (séquence tronquée)

Figure 37 : Détail des séquences carboxyliques de MdoH, de la fusion au niveau de l'acide aminé 833 et des 2 versions tronquées. Les acides aminés qui ne sont pas en gras sont les acides aminés différents de la séquence sauvage de MdoH.

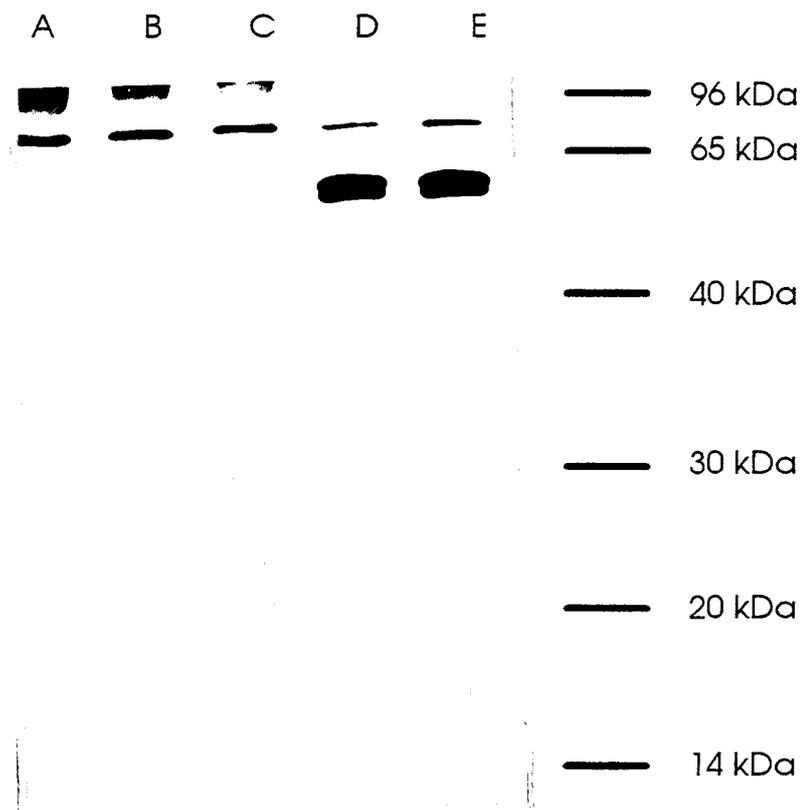


Figure 38 : Autoradiographie des protéines marquées par les plasmides :
 piste A : pNF469 (*mdoH* ayant un codon stop au niveau de l'acide aminé 833)
 piste B : pNF441 (*mdoH*)
 piste C : pNF441 (*mdoH*, muté au niveau de l'arginine 306 de MdoH)
 piste D : pNF461 (*mdoGH*)
 piste E : pNF461 (*mdoGH*, muté au niveau de l'arginine 306 de MdoH)

815 **V W N S P E R Y S S W V S Y Y E G I K L N P L A L R K P D A A S Q** = 847 AA (séquence sauvage)

815 **V W N S P E R Y S S W V S Y Y E G I K P L R** = fusion au niveau de l'acide aminé 833 *mdoH-blaM* active.

815 **V W N S P E R Y S S W P C V T Q K R W** = 833 AA (séquence tronquée)

815 **V W N S** = 818 AA (séquence tronquée)

Figure 37 : Détail des séquences carboxyliques de MdoH, de la fusion au niveau de l'acide aminé 833 et des 2 versions tronquées. Les acides aminés qui ne sont pas en gras sont les acides aminés différents de la séquence sauvage de MdoH.

dégradées. Afin de vérifier cette possibilité, j'ai substitué la partie 3' du gène *mdoH* cloné dans le vecteur pT7-6 par la partie 3' du gène tronqué et modifié aboutissant à une activité partielle de MdoH (le plasmide résultant est pNF469). Le résultat du marquage de la protéine (Figure 38) permet d'affirmer qu'elle n'est pas dégradée, et qu'elle est apparemment exprimée à un niveau identique au niveau sauvage.

Enfin, il restait possible que les acides aminés modifiés entraînent un changement conformationnel de l'extrémité carboxylique. Cette hypothèse a été testée par une estimation de la structure secondaire de cette région. Il en ressort que la région sauvage est prédite sous forme de feuillets β , alors que la région tronquée modifiée est prédite sous forme d'hélice α . Ces deux prédictions ayant un très bon score, on peut avancer que le changement de conformation de cette région est probablement à l'origine des différents niveaux d'activité.

c) Comportement des différents mutants dans une souche sauvage

Les différentes protéines tronquées décrites précédemment fournissent un outil de choix pour tenter de déterminer si l'activité de la protéine MdoH nécessite un complexe de plusieurs monomères. Les différents plasmides permettant l'expression de différentes versions tronquées de la protéine MdoH ont été introduits dans la souche JM83, et leur contenu en MDO a été dosé. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

souches	³ H-glycérol (cpm)
pYZ4 / JM83	6900
pNF309 (847 AA) / JM83	9400
fusion au 833 ° AA / JM83	8000
codon stop au 833 ° AA / JM83	5700
codon stop au 818 ° AA / JM83	6000
fusion au 645 ° AA / JM83	4400
fusion au 623 ° AA / JM83	6400
fusion au 541 ° AA / JM83	6400
fusion au 470 ° AA / JM83	6400

Ces différents dosages laissent apparaître qu'aucune protéine tronquée n'influence, de manière conséquente, la biosynthèse du MDO effectuée à partir de la copie chromosomique sauvage. Ceci ne nous permet pas de conclure à l'existence, ou à l'inexistence, d'un complexe de plusieurs

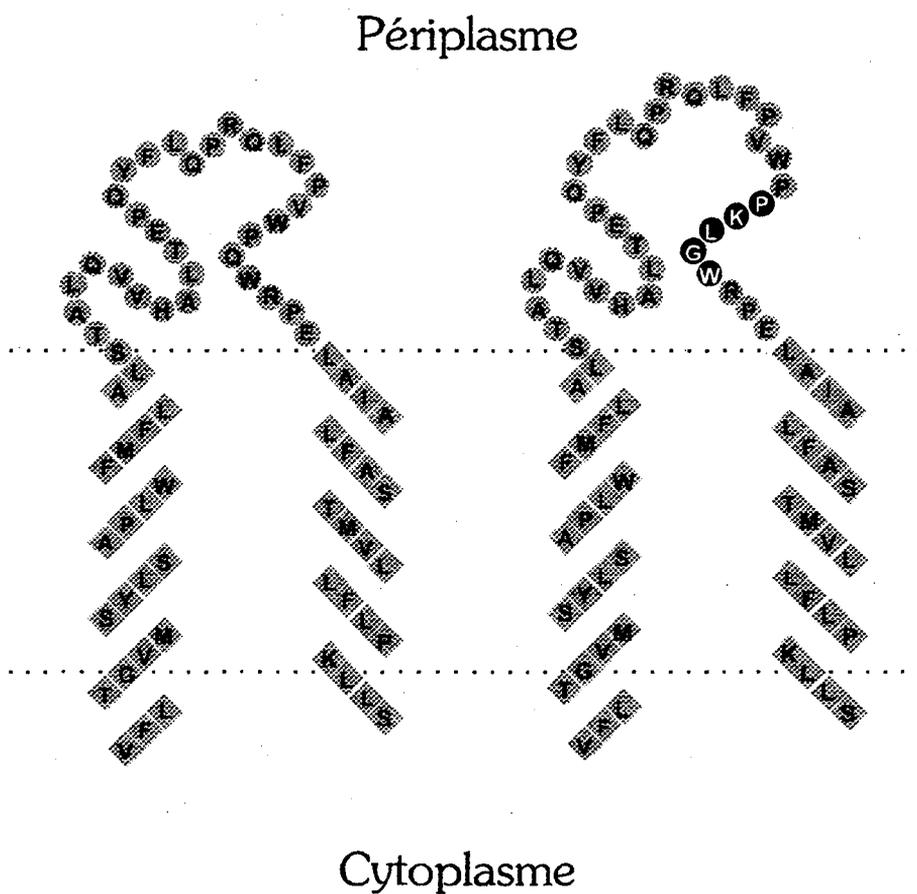


Figure 39 : Séquence des acides aminés de la région de la seconde boucle de MdoH :

à gauche la séquence sauvage

à droite la séquence modifiée par l'insertion d'un oligonucléotide

En blanc sur fond noir sont indiqués les acides aminés dont la séquence nucléotidique qui leur correspond est différente de la séquence sauvage

monomères. En effet, si la formation du complexe met en jeu l'extrémité carboxylique de la protéine, il est possible qu'aucune protéine tronquée ne puisse encore entretenir des interactions avec les protéines sauvages. Donc, seules les copies sauvages pourraient entretenir des interactions efficaces entre elles. Cependant, dans ce cas, il faut en déduire que la protéine tronquée au niveau de l'acide aminé 833 (ayant une faible activité), possède encore une capacité d'association avec des protéines sauvages qui n'empêchent pas ces dernières d'être pleinement actives. Quoiqu'il en soit, le fait de surexprimer des protéines tronquées inactives, s'insérant dans la membrane, n'a aucun effet sur la biosynthèse du MDO par la copie sauvage.

C : PREMIERES EXPLOITATION DE LA TOPOGRAPHIE DE MdoH

1°) INSERTION D'UN OLIGONUCLEOTIDE

L'établissement de la topographie de MdoH a permis de mettre en évidence qu'elle ne comportait que deux petites régions périplasmiques. Mise à part MdoH, les protéines connues à ce jour spécifiquement impliquées dans la voie de biosynthèse du MDO, sont toutes localisées dans le périplasma. Il était donc intéressant de tenter de modifier l'une des deux régions périplasmiques. La méthode choisie consiste à introduire un (ou plusieurs) oligonucléotide de synthèse au niveau de la séquence nucléotidique correspondant à la région ciblée, sans en interrompre le cadre de lecture. Pour ceci, il est préférable de disposer d'un site de restriction unique au niveau de cette séquence. Ceci est le cas pour le site de restriction *BglII* de coordonnée 1,7 kb sur la Figure 30 (page 84), ce qui correspond à la 2ème boucle périplasmique. Les extrémités libérées par cette enzyme doivent être préalablement rendues franches par le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I, avant d'y insérer un oligonucléotide de 12 paires de bases. Afin de faciliter le repérage des clones qui auront inséré une ou plusieurs copies de cet oligonucléotide, nous avons choisi un oligonucléotide possédant un site de restriction *HindIII*, site absent de toute la séquence de l'opéron *mdoGH*. Cette insertion a été effectuée sur le plasmide pNF466, qui est un dérivé de pNF309 dans lequel il n'y a plus qu'un seul site *BglII* (celui de *mdoH*), par Elisabeth Kosciarcz, lors de son DEA (1995).

Les résultats qui ont été obtenus, montrent que l'insertion de cet oligonucléotide suffit à diminuer de 75% la quantité de MDO synthétisée. Cette diminution peut être due, soit à la nature des nouveaux acides aminés introduits, soit à la modification de la conformation locale de la boucle périplasmique, soit encore à la répercussion de la modification locale aux segments transmembranaires voisins (Figure 39). Cette insertion d'oligonucléotide pourrait donc perturber des interactions protéine-protéine, ou la fonction intrinsèque de MdoH. Des études complémentaires sont

actuellement en cours afin de préciser exactement la ou les causes de la diminution de la quantité de MDO.

2°) MUTAGENESE DIRIGEE

Lors du séquençage nucléotidique de *mdoH*, il a été mis en évidence une très forte homologie avec le gène *hrpM* de *P. syringae* (voir page 23 ; Loubens et coll., 1993). Cette homologie est moyenne entre les acides aminés 60 et 300 de MdoH, puis devient très importante jusqu'au niveau des acides aminés 700, où elle redevient moyenne. C'est au tout début de la très forte homologie que se situe une séquence d'acides aminés particulière : une succession de 6 arginines. De telles séquences ne sont retrouvées que dans des protéines très affines pour l'ADN, les histones par exemple. De plus l'environnement de ces arginines renforce le caractère hydrophile positif de cette région. En effet, sur 10 résidus consécutifs, il y a 7 arginines, 2 lysines, et 1 valine. C'est dans le but de confirmer l'éventuel rôle de cette région que j'ai effectué une expérience préliminaire de mutagenèse dirigée (fiche technique N°7).

Le résultat de cette mutagenèse, effectuée sur le plasmide pNF309, modifie la séquence de deux nucléotides, ce qui provoque le changement du résidu arginine (en position 318) en un résidu alanine. Le dosage de la quantité de MDO synthétisée par ce mutant a fait apparaître une baisse de cette quantité de 20 %. Le fragment *SmaI-KpnI* interne à *mdoH* de ce plasmide mutant a été échangé avec le fragment *SmaI-KpnI* du plasmide exprimant la fusion au niveau de l'acide aminé 833. Le nouveau plasmide réalisé exprime donc une protéine de fusion mutée au niveau de l'arginine 318, et permet d'obtenir une quantité de MDO inférieure de 20 % à la quantité obtenue par la protéine de fusion sauvage.

Le marquage radioactif de la protéine mutée a été effectué grâce au plasmide pT7-6. On n'observe aucune différence entre la protéine mutée et la protéine sauvage (Figure 38, page 102). De plus, cette version mutée de *mdoH* a été introduite dans le plasmide pNF461 (opéron *mdoGH* dans pT7-6). Nous n'observons aucune différence entre la version sauvage et la version mutée, aussi bien au niveau de MdoG que de MdoH (Figure 38, page 102).

Enfin, quelle que soit la souche utilisée (JM83, *mdoH200::Tn10* ou *mdoA1*) la diminution de 20 % est toujours confirmée, et la régulation osmotique n'est jamais affectée. Il convient d'être prudent dans l'interprétation de ce résultat. En effet la mutation effectuée n'est peut-être pas assez forte pour altérer une éventuelle interaction entre MdoH et l'ADN, mais est déjà assez importante pour affecter la biosynthèse du MDO. Cette séquence semble donc plus importante pour la fonction catalytique de MdoH que pour un éventuel rôle dans la régulation osmotique. A moins que la mutation réalisée soit particulière, ayant une conséquence sur la fonction catalytique plus que sur la fonction de régulation. En effet, le remplacement du résidu arginine par le résidu alanine pourrait ne

perturber que faiblement la conformation locale, et plus fortement la conformation globale du grand domaine cytoplasmique. Ceci aurait alors une répercussion plus importante sur la réaction de biosynthèse que sur le mécanisme de la régulation osmotique. Pour résoudre les différentes questions posées par ce premier résultat, il nous faut entreprendre de nouvelles mutations dirigées dans cette région.

3 - DISCUSSION

I - EXPRESSION DU GÈNE *mdoH*

1°) LE COUPLAGE TRADUCTIONNEL ENTRE *mdoG* ET *mdoH*

Le séquençage nucléotidique de l'opéron *mdoGH* avait permis de proposer trois codons d'initiation possibles pour *mdoH*. La détermination de la taille d'une protéine MdoH tronquée dans sa partie carboxylique a permis de préciser que le codon d'initiation du gène *mdoH* est celui qui chevauche le codon stop du gène *mdoG*. La protéine MdoH est donc constituée de 847 acides aminés.

Dans un opéron il est fréquent d'observer un chevauchement du cadre de lecture entre deux gènes. Parmi les différents chevauchements possibles, on trouve deux possibilités majeures : le codon d'initiation et le codon stop sont décalés, soit d'un seul nucléotide, soit de quatre. Dans le cas de *mdoGH* le décalage est d'un seul nucléotide. Il faut préciser que le chevauchement du cadre de lecture, par la variation de la distance entre les deux gènes cotranscrits, est un facteur influençant le niveau d'expression du deuxième gène (Eyre-Walker, 1995).

2°) LA SUREXPRESSION DE MdoH

Le clonage du gène *mdoH* sous la dépendance du promoteur *placUV5* a permis de constater que l'expression de *mdoH* à partir d'un plasmide à copies multiples est faiblement amplifiée. En effet, la quantité de MDO n'est que légèrement augmentée et la quantité de la protéine MdoH reste indécélable à partir de la coloration d'un gel de polyacrylamide au bleu de Coomassie.

La localisation membranaire de MdoH est certainement à l'origine de cette faible expression. Lorsque l'on exprime le gène *mdoH* et des versions tronquées de ce gène à partir du promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7, on constate que les bandes correspondant aux versions tronquées sont beaucoup plus intenses que les bandes correspondant à la version sauvage. Ceci est d'autant plus surprenant que le nombre de résidus soufrés est moins important dans les versions tronquées. On remarquera tout particulièrement que l'expression de la version la plus courte provoque l'apparition de la bande la plus intense alors que cette version possède 6 fois moins de résidus soufrés que la version sauvage.

Les résultats de l'étude topographique de MdoH montrent que la protéine tronquée la plus courte est certainement soluble. Ceci expliquerait pourquoi on peut l'exprimer en plus grande quantité par rapport aux autres protéines tronquées et à la protéine sauvage, qui sont toutes membranaires. La surexpression de protéines membranaires peut provoquer des désordres dans la

membrane. Ces désordres pourraient se révéler létaux pour la cellule, qui empêcherait alors l'insertion d'un plus grand nombre de protéines dans la membrane. Une autre possibilité est la formation de corps d'inclusion renfermant les protéines surexprimées.

L'expression de l'opéron *mdoGH* sous le contrôle de promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7 permet de radio marquer les protéines MdoG et MdoH. Une fois de plus, bien que possédant moins de résidus soufrés que MdoH, MdoG présente une intensité très supérieure.

3°) LOCALISATION DU PROMOTEUR SECONDAIRE

Les différents résultats obtenus ont démontré que le fragment *MluI-SspI*, comportant la fin de la phase codante du gène *mdoG* et la totalité de la phase codante du gène *mdoH*, possédait une séquence promotrice. Cette séquence permet l'expression de *mdoH* à un faible niveau. L'ATG de *mdoH* n'étant pas précédé d'une séquence de Shine et Dalgarno, il devenait possible que la séquence promotrice était située beaucoup plus en aval de l'ATG de *mdoH*, et qu'ainsi le chevauchement du cadre de lecture était conservé.

8 nucléotides en amont d'un codon ATG (correspondant au codon 488 de *mdoG*), il y a une séquence AGAAAA qui est certes, éloignée de la séquence consensus de Shine et Dalgarno (AGGAGG), mais qui est assez proche de celle déterminée pour le promoteur de l'opéron *mdoGH* (TGAAAC), qui elle est située 12 nucléotides en amont du premier ATG (Loubens et coll., 1993), alors que la distance optimale est de 8 nucléotides (Ringquist et coll., 1992). De plus, au niveau des codons 465 et 466 de *mdoG* il y a une séquence TATAAC, très proche de la séquence consensus du -10 (TATAAT). Enfin, exactement à la position -35 il y a une séquence GTGAGA qui reste proche de la séquence consensus (TTGACA). Ces séquences ne sont certainement pas des séquences qui pourraient permettre seules d'obtenir un fort niveau d'expression. D'ailleurs, l'expression du promoteur secondaire ne permet jamais d'obtenir une quantité sauvage de MDO. Toutefois, elles ne sont pas très éloignées dans leur ensemble de celles déterminées pour le promoteur de l'opéron. Enfin, au regard de ces séquences, et au regard des différents résultats précédemment obtenus au laboratoire, on conçoit aisément que la conformation locale de l'ADN puisse changer la « force » de ce promoteur. Aujourd'hui, il nous faut confirmer que ce promoteur secondaire potentiel permet ou ne permet pas une expression de *mdoH* sur le chromosome et non pas seulement à partir de petits plasmides à copies multiples.

4°) L'OPÉRON *mdoGH* SERAIT REPRIME A HAUTE OSMOLARITE

Le promoteur de l'opéron *mdoGH* devrait permettre une forte expression des deux gènes car sa séquence est assez proche de celles de promoteurs forts. Cependant, une fusion *mdoG-phoA* placée en copie unique sur le chromosome ne s'exprime que faiblement dans les conditions de

laboratoire (Loubens, 1993). De plus, il n'a jamais été possible de visualiser la quantité d'ARN produite à basse osmolarité à partir de la transcription de l'opéron sur le chromosome. D'autre part, il n'a jamais été possible de détecter les protéines MdoG et MdoH lorsqu'elles sont exprimées à partir de l'opéron placé dans un plasmide à copies multiples. Ces différentes observations permettent de suggérer que ce promoteur serait réprimé. Afin de confirmer cette hypothèse J.-M. Lacroix et F. Page, au laboratoire, tentent de déterminer quel est le mécanisme de la régulation du promoteur de l'opéron. Pour ceci, deux approches sont utilisées : la première nécessite une mutagenèse par agents chimiques afin d'obtenir des mutants de régulation ; la deuxième consiste à effectuer des délétions ménagées des séquences situées en amont du promoteur, séquences qui pourraient être la cible d'un facteur de régulation.

II - FONCTIONS DES PROTEINES MdoG ET MdoH

A) HYPOTHESES SUR LE ROLE DE LA PROTEINE MdoG

La protéine MdoG est localisée dans le périplasma, tout comme le MDO. Aucune fonction enzymatique précise ne lui a encore été associée. A partir des connaissances actuelles de la voie de biosynthèse du MDO, on peut imaginer quatre fonctions possibles pour MdoG.

1°) LA FONCTION D'INITIATION

En premier lieu, on pourrait impliquer MdoG dans le processus d'initiation de l'allongement des chaînes de glucose. Comme le montre le système *in vitro* mis au point par Weissborn et Kennedy (1984), il est nécessaire d'ajouter une amorce pour obtenir des chaînes de polyglucose. Il est donc légitime de penser qu'*in vivo* une amorce est utilisée pour la synthèse du MDO. Le cas d'une protéine servant d'accepteur dans une voie de biosynthèse de composés glycaniques a déjà été décrit (Weisgerber et Troy, 1991). De plus, les travaux de Harkness et Braun (1990), ont permis d'écarter l'intervention du bactoprénol comme accepteur lipidique dans la biosynthèse du MDO, alors qu'il joue le rôle d'accepteur lipidique dans la biosynthèse, entre autres, du peptidoglycane et de la partie antigène O du LPS. Il faut cependant reconnaître que l'intervention d'un accepteur lipidique d'un autre type n'a pas été complètement écartée.

L'hypothèse selon laquelle une protéine serait l'accepteur reste donc possible. Ceci est d'ailleurs le cas chez les Rhizobiacées où l'UDP-glucose est lié aux protéines NdvB et ChvB. Chez *E. coli* cette hypothèse peut être confortée par le fait que la biosynthèse du MDO nécessite en permanence la synthèse d'une ou plusieurs protéines (Lacroix, 1989). Toutefois, si MdoG jouait ce

rôle d'accepteur cela signifierait qu'elle puisse jouer un rôle dans le cytoplasme avant qu'elle n'atteigne le périplasme. Il s'agirait alors d'un nouveau type de protéine jamais encore décrit.

2°) LA FONCTION DE LIBERATION

Il est raisonnable de penser que la protéine MdoG possède une activité dans le périplasme, puisqu'elle est localisée dans celui-ci. En considérant que la biosynthèse du MDO débute sur un accepteur, il faut admettre que le MDO puisse être séparé de cet accepteur. L'activité enzymatique devant intervenir à ce niveau pourrait être attribuée à MdoG.

Ainsi, dans les deux hypothèses précédentes, il serait indispensable de synthétiser MdoG et MdoH simultanément pour que la biosynthèse du MDO ait lieu correctement. Ceci est tout à fait en accord avec l'organisation des gènes *mdoG* et *mdoH* en opéron.

3°) LA FONCTION DE RAMIFICATION

Le système *in vitro* de Weissborn et Kennedy (1984), permet l'obtention de chaînes linéaires de polyglucoses liés uniquement en β ,1-2. Ceci peut nous conduire à supposer que la ramification de cette chaîne linéaire, par des glucoses liés en β ,1-6, peut être réalisée par une enzyme périplasmique. Dans ce cas, la protéine MdoG devient la candidate la plus sérieuse. Il faut cependant préciser que ce système *in vitro* placé en présence de fractions solubles d'*E. coli*, ne permet pas la synthèse de chaînes ramifiées. Cette observation doit être modérée par le fait que les expériences menées peuvent détruire des interactions existantes *in vivo*, interactions qu'il ne serait pas possible de rétablir *in vitro*.

De plus, il n'a jamais été mis en évidence *in vivo* de chaînes linéaires de glucoses liés en β -1,2 libres. Ainsi, il est probable que la ramification de ces chaînes s'effectuent alors qu'elles sont encore attachées à un accepteur, ou à la protéine qui les synthétise. Il est donc nécessaire que MdoG entretienne des interactions avec la protéine effectuant la biosynthèse. A moins que la ramification ait lieu dans le cytoplasme ce qui signifierait, non seulement que MdoG ne peut pas jouer la fonction d'enzyme de ramification, mais aussi que les chaînes linéaires obtenus par le système *in vitro* n'existent pas *in vivo*.

4°) LA SUBSTITUTION SECONDAIRE

La phosphoglycérol transférase II est responsable *in vivo* de la polysubstitution des molécules de MDO. Elle est périplasmique, et sa masse a été estimée à 56 kDa (Goldberg et coll., 1981). Il pourrait donc s'agir de MdoG. Dans ce cas, il est surprenant que des mutants *mdoG* ne synthétisent pas du tout de MDO, alors qu'on s'attendrait à ce qu'ils ne produisent que des molécules de MDO

moins ou pas du tout substituées. C'est en effet le cas des mutants *mdoB*. On peut toutefois imaginer que la fonction des molécules de MDO nécessite une substitution complète, et que sans cette substitution, ces molécules ne pourraient pas jouer leur fonction. Il faut alors attribuer à MdoG une deuxième fonction qui lui permettrait de bloquer très tôt (en tant qu'hydrolase libérant le MDO de son accepteur par exemple) la biosynthèse du MDO, afin que la cellule ne synthétise pas inutilement des molécules inefficaces.

Enfin, le fait que les glucanes périplasmiques de *P. syringae* soient dépourvus de tout substituant, alors que les gènes nécessaires à leur biosynthèse possèdent une très forte homologie avec l'opéron *mdoGH* d'*E. coli*, suggère que la protéine codée par le premier gène puisse jouer une même fonction chez ces deux organismes. Ceci ôterait donc toute intervention de MdoG dans une étape de substitution. Dans un proche avenir, on peut espérer que la purification de MdoG pourra nous permettre de préciser son activité.

5°) LA PROTEINE CODEE PAR L'ALLELE *mdoG215*

L'allèle *mdoG215* présente une modification de la séquence nucléotidique de *mdoG* au niveau du codon 405. Il a été effectué un ajout de 4 nucléotides qui modifie le cadre de lecture de *mdoG*. Ainsi, la protéine issue de l'expression de l'allèle *mdoG215* est plus courte de 89 acides aminés et présente une séquence différente sur les 16 derniers résidus. Cette protéine modifiée est instable et est clivée, probablement à son extrémité carboxylique, en un produit plus stable. Le plasmide permettant l'expression de cet allèle, placé dans une souche *mdoG202::neo*, permet de compléter celle-ci en restaurant une quantité de MDO inférieure de 30 % à la quantité sauvage. Ce résultat conduit à formuler deux hypothèses : soit la protéine modifiée possède une activité enzymatique affectée, soit la protéine instable possède une activité normale et alors sa dégradation rapide ne lui permet pas de jouer pleinement son rôle.

B) LA PROTEINE MdoH EST UNE GLUCOSYLTRANSFERASE

Dès l'introduction de ce travail, il a été admis que la protéine MdoH était une glucosyltransférase. Aujourd'hui, aucune preuve expérimentale ne permet d'affirmer que seule MdoH est responsable de cette activité. Il reste possible que MdoH ne soit qu'une protéine absolument nécessaire, mais ne soit pas la protéine effectuant la réaction.

1°) L'ACTIVITE GLUCOSYLTRANSFERASE *IN VITRO*

Cette activité, qui a été mise en évidence par Weissborn et Kennedy (1984) était jusqu'à présent le seul moyen d'étudier les premières étapes de la biosynthèse du MDO. Cependant, ce système a très vite montré ses limites en n'ayant jamais permis de synthétiser *in vitro* des molécules

complètes de MDO. De plus, il a été montré, que ce système est indépendant de la présence ou l'absence de la protéine MdoG, alors que celle-ci est absolument requise pour la biosynthèse *in vivo*.

2°) L'ACTIVITE GLUCOSYLTRANSFERASE *IN VIVO*

Le système *in vitro*, cité précédemment, ne permet pas de suivre la biosynthèse du MDO dans sa totalité. La mise au point d'une nouvelle méthode permettant de révéler l'activité glucosyltransférase était donc devenue nécessaire afin d'espérer pouvoir élucider toutes les étapes gouvernant la biosynthèse du squelette glucidique.

Les résultats acquis à ce jour permettent d'affirmer qu'un nouveau moyen de révéler l'activité glucosyltransférase a été mis au point. Cependant, cela ne signifie pas que celui-ci permettra de répondre à toutes les questions concernant les premières étapes de la biosynthèse du MDO.

a) Les inconvénients du nouveau système *in vivo*

L'inconvénient majeur de cette technique est la présence de 3 pics dans le profil d'élution chromatographique. En effet, les deux pics qui ne sont pas spécifiques du MDO pourraient masquer la présence de produits intermédiaires.

Le pic I est très probablement constitué de fragments de LPS. Afin d'empêcher l'utilisation de l'UDP-glucose pour la biosynthèse du LPS, il a été tenté de construire un double mutant *galU* et $\Delta rfaGI$. La mutation $\Delta rfaGI$ a en effet été décrite comme suffisante pour interrompre la biosynthèse du LPS avant qu'elle n'utilise l'UDP-glucose (Pradel et coll., 1992). Malheureusement, plusieurs tentatives n'ont pas permis d'obtenir une telle souche.

Un autre inconvénient est dû à la technique d'extraction au charbon de bois. Cette méthode ne permet pas en effet de purifier des intermédiaires non solubles, c'est à dire des intermédiaires qui seraient accrochés à la membrane cytoplasmique. D'autre part, on s'aperçoit que cette technique permet aussi l'extraction de l'UDP-glucose, ce qui représente un inconvénient majeur lorsque l'on effectue des réactions de durée courte. Afin de palier à ces inconvénients une autre méthode d'extraction devrait être mise au point.

b) Les avantages et les perspectives de ce nouveau système *in vivo*

Les deux avantages de cette technique résident dans sa facilité de mise en oeuvre et dans l'obtention d'un produit fini, sans doute identique au MDO. Des études complémentaires sur la nature du pic II sont actuellement en cours au laboratoire afin de caractériser sa structure.

La mise au point de cette nouvelle méthode peut permettre d'envisager une étude concernant l'identification de la fonction de la protéine MdoG. En effet, on peut d'ores et déjà affirmer que la protéine MdoG est absolument nécessaire aux premières étapes de la biosynthèse du MDO.

Toutefois, ceci ne signifie pas qu'elle joue le rôle de l'accepteur ou un rôle dans la fonction de libération, mais elle en devient la principale candidate. Enfin, l'expression de l'allèle *mdoG215* dans la souche NFB1809 (CA10, *mdoG202::neo*) pourra peut-être nous donner une indication sur la fonction de MdoG.

Ce nouveau système de dosage a mis en évidence la nécessité de remettre les cellules en culture afin d'obtenir une quantité de MDO repérable. On peut supposer que lors du choc cryologique qui permet l'entrée de l'UDP-glucose, il y ait aussi une « fuite » de molécules indispensables à la biosynthèse du MDO. Il devient alors impératif pour les cellules de synthétiser à nouveau ces molécules « perdues » afin de restaurer la biosynthèse de MDO. Parmi ces molécules on peut considérer les protéines périsplasmiques MdoG et MdoB. Cette observation est à mettre en relation avec le fait qu'il est nécessaire qu'une synthèse de protéine en continu ait lieu pour que la biosynthèse du MDO puisse s'effectuer (Lacroix, 1989). Ceci nous permet de soulever une nouvelle question à propos du système *in vitro* de Weissborn et Kennedy. En effet, ces auteurs décrivent la formation de chaînes de polyglucose dans un système où la synthèse de protéines n'est plus possible. On peut alors penser que c'est l'ajout d'une amorce dans ce système qui permet la synthèse *in vitro*. Cette amorce pourrait donc jouer la fonction d'une protéine qu'il n'est pas possible de synthétiser *in vitro*. En conclusion, les 2 systèmes de dosage de l'activité glucosyltransférase font apparaître la nécessité d'un accepteur. La nature de celui-ci demeure indéterminée. Cependant nous privilégions les résultats des expériences *in vivo* qui sont en faveur d'un accepteur de type protéique.

D'autre part, la réalisation de ce système étant très simple, il est possible d'entreprendre des études en variant les conditions expérimentales. Ainsi, on peut envisager l'introduction d'analogues structuraux de l'UDP-glucose afin de mener des études d'inhibition ou de structure. Par exemple, l'UDP-acide gluconique porte une fonction carboxylique sur le carbone 6 du glucose. Si l'on suppose que cette molécule peut être reconnue par la glucosyltransférase, il sera alors possible de synthétiser des molécules linéaires d'acides gluconiques uniquement liés en β ,1-2. Par contre, le branchement des glucoses en position 6 ne pourra vraisemblablement pas être effectué. Ainsi, nous pourrions obtenir *in vivo* des composés analogues à des précurseurs du MDO et nous pourrions alors d'observer leur localisation. Ceci pourrait nous permettre de préciser si la ramification a lieu avant ou après le passage des molécules naissantes de MDO à travers la membrane.

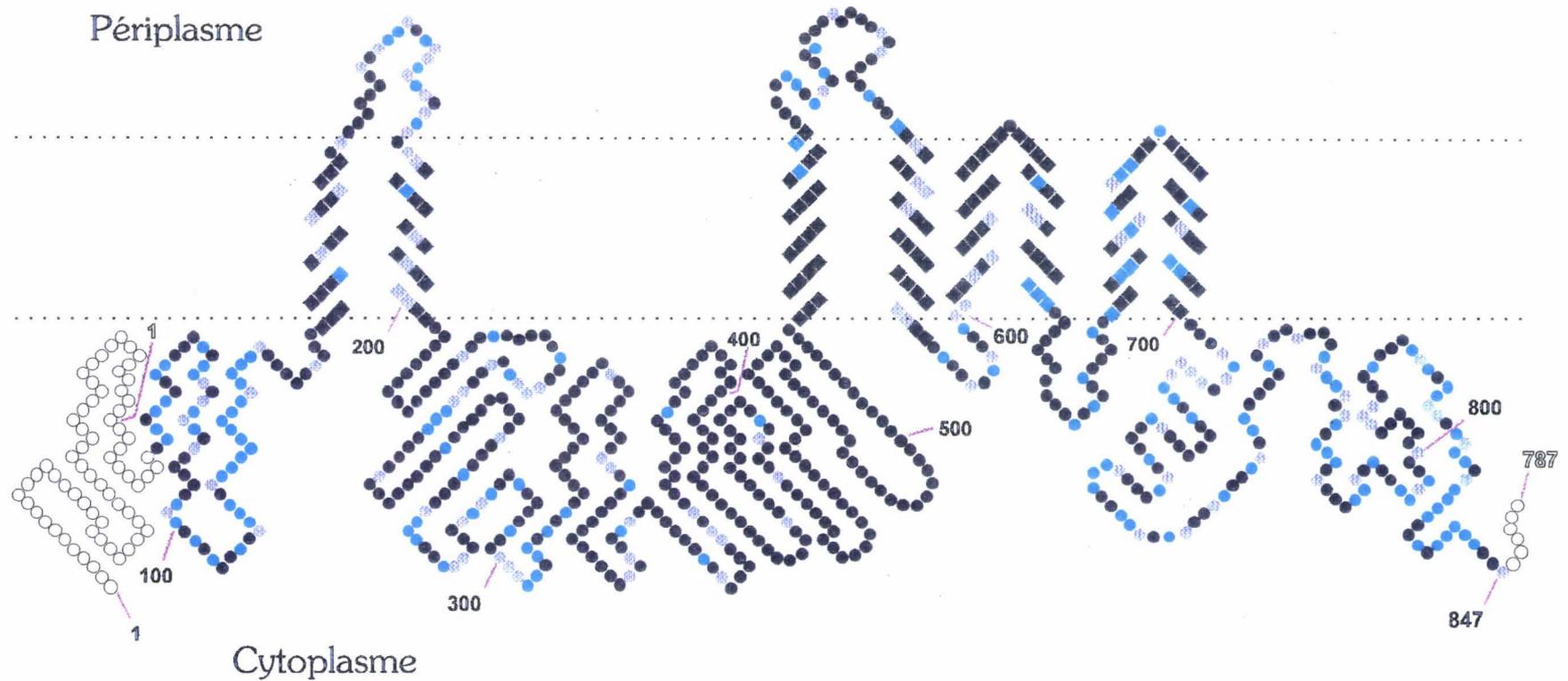


Figure 40 : Représentation sur le modèle topographique de MdoH de l'homologie entre MdoH et HrpM.

Les ronds de couleur noire indiquent la position des acides aminés identiques et les ronds de couleur violet celle des acides aminés homologues

Les ronds de couleur bleu vif indiquent la position des acides aminés différents

Du côté amino-terminal les cercles symbolisent les acides aminés supplémentaires de MdoH et du côté carboxy-terminal ceux de HrpM

Les chiffres de couleur blanche indiquent la position du premier et du dernier résidu de HrpM

III - RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DE LA PROTEINE MdoH

A) LA PROTEINE MdoH EST UNE PROTEINE MEMBRANAIRE A 8 SEGMENTS

L'utilisation de la technique de fusion de gènes avec la β -lactamase a permis de démontrer que la protéine MdoH est constituée de 8 segments transmembranaires. L'exploitation des différentes données, établies lors de l'analyse topographique d'autres protéines membranaires, a été nécessaire au positionnement des 8 segments.

La topographie de MdoH permet d'exploiter différemment l'homologie entre HrpM et MdoH. En effet, cette homologie devient une quasi identité à partir de l'acide aminé 300 de MdoH, c'est à dire à partir du deuxième tiers du domaine central cytoplasmique. Cette quasi identité se prolonge ainsi jusqu'au niveau de l'acide aminé 670 de MdoH, c'est à dire au niveau du 7ème segment transmembranaire. Il est donc probable que cette grande région permet de conserver une fonction identique à ces deux protéines. Cette homologie permet d'ailleurs un échange fonctionnel entre les deux protéines.

On peut aussi raisonnablement supposer que la topographie de HrpM est identique à celle de MdoH. La construction d'une protéine de fusion avec la β -lactamase au niveau de l'acide aminé 686 de HrpM m'a permis de démontrer que non seulement cette protéine hybride est localisée dans la membrane, mais aussi que son phénotype est identique à celui prévu par la comparaison topographique avec MdoH, c'est à dire un phénotype cytoplasmique (la position 686 de HrpM correspond à la position 753 de MdoH, Figure 40).

On peut s'interroger sur la nécessité pour ces deux protéines de conserver une région amino-terminale d'homologie très faible. Il est vraisemblable que cette région soit moins importante pour leur fonction, ceci d'autant plus que le premier acide aminé de HrpM correspond au 66ème résidu de MdoH.

En dosant l'activité β -lactamase de la fusion au niveau de l'acide aminé N°175 de MdoH, j'ai montré que cette protéine hybride est localisée dans la membrane. On peut donc affirmer que le premier segment suffit à la localisation membranaire de la région amino-terminale. On peut d'autre part supposer que les deux premiers segments transmembranaires participent entre autre au maintien de la conformation de type α/β du domaine central.

B) PREMIERES RELATIONS STRUCTURES-FONCTIONS DE MdoH

1°) LE SITE D'INTERACTION AVEC L'UDP-GLUCOSE EST CYTOPLASMIQUE

Malgré de très nombreuses séquences de gènes codant des UDP-glucosyltransférases, aucune comparaison n'a permis de mettre en évidence les caractéristiques d'un site d'interaction entre

l'UDP-glucose et ces différentes enzymes. Hundle et coll. (1992) ont cependant proposé un site de reconnaissance pour l'UDP-glucose à partir d'une faible homologie entre une UDP-glucosyltransférase d'*Erwinia herbicola* et 3 UDP-glucuronosyltransférases de mammifères. En comparant ce site proposé avec la séquence de MdoH, nous n'obtenons aucune homologie suffisamment importante pour confirmer la séquence proposée. De plus, la région de MdoH qui présente le plus de similarité avec ce site correspond à une région située entre le début du segment VI et le début du segment VII, c'est à dire dans une région très hydrophobe. Il est donc très peu probable que le site proposé soit réellement le site de reconnaissance de l'UDP-glucose pour MdoH.

La topographie de MdoH permet de mettre en évidence qu'un domaine de plus de 300 acides aminés est situé dans le cytoplasme. L'UDP-glucose n'étant présent que dans le cytoplasme d'*E. coli*, on suppose que ce domaine joue un rôle dans la reconnaissance de l'UDP-glucose et ce d'autant plus que sa séquence d'acides aminés est très conservée avec celle de HrpM.

2°) MdoH PERMETTRAIT-ELLE LA TRANSLOCATION DU MDO ?

Etant donné que la fusion au niveau de l'acide aminé 175 de MdoH est suffisante à la localisation membranaire de MdoH, on peut se demander pourquoi cette protéine possède 8 segments transmembranaires. Il est probable que ce nombre élevé de segments puisse être nécessaire à une fonction de translocation du MDO. Jusqu'à présent cette étape reste inconnue bien qu'elle soit absolument nécessaire à la localisation périplasmique du MDO.

La topographie de MdoH a des caractéristiques proches de celle de MalF, une protéine impliquée dans le transport du maltose. Toutes les deux possèdent 8 segments, répartis en 2 groupes hydrophobes séparés par un grand domaine central. Cependant une particularité les différencie. Ce grand domaine est localisé dans le cytoplasme pour MdoH alors qu'il est localisé dans le périplasma pour MalF.

Le transport du maltose ne requiert pas uniquement MalF. Il est nécessaire qu'il se forme un complexe entre les protéines MalF, MalG et MalK pour que le maltose puisse traverser la membrane. Jusqu'à présent, seules MalG et MalF étaient des protéines qui possédaient plusieurs segments transmembranaires. Récemment, des expériences d'accessibilité aux protéases ont montré que MalK possédait au moins deux segments transmembranaires (Schneider et coll., 1995). A l'heure actuelle, il n'a pas été déterminé précisément comment s'effectue le passage du maltose mais on peut supposer que les segments transmembranaires forment un canal. Par analogie, on peut penser qu'il soit nécessaire de mettre en jeu plusieurs protéines afin d'effectuer la translocation du MDO. Les premiers résultats obtenus par Roman Efremov nous démontrent que différents segments de MdoH présentent des caractéristiques de segments ayant des interactions avec d'autres segments. Ceci nous

permet d'envisager que tout ou partie des différents segments de MdoH sont en relation entre eux, ou en relation avec une autre protéine membranaire.

Cependant, nous ne connaissons pas la structure de la molécule qui est transloquée. Il pourrait s'agir du squelette glucidique, ramifié ou non, ou d'un produit plus court qui serait transloqué puis réarrangé dans le périplasma pour donner une molécule de plus grande taille. Cette question de taille est en rapport avec le nombre de segment nécessaire pour former un canal à la fois suffisamment grand et de spécificité pointue. A ce titre, le nombre de 8 segments peut paraître faible pour permettre la translocation du squelette glucidique complet, par rapport à des transporteurs de molécules glucidiques comme LacY (12 segments) ou le complexe MalF, MalG, MalK (au moins 15 segments). On peut donc supposer qu'une autre protéine membranaire, encore inconnue, apportant un nombre de segments supplémentaires participe elle aussi à la translocation du MDO.

3°) LA DEUXIEME BOUCLE PERIPLASMIQUE EST IMPLIQUEE DANS L'ACTIVITE DE MdoH

L'étude topographique de MdoH a mis en évidence la présence de deux boucles périplasmiques de 28 et 32 acides aminés. L'insertion d'un oligonucléotide au niveau de la séquence correspondant à la deuxième boucle périplasmique a permis de déterminer que cette boucle était impliquée dans l'activité de MdoH. On ne sait pas si la conséquence observée est due au changement de la nature de quelques acides aminés ou au changement de la conformation de la chaîne polypeptidique. L'oligonucléotide inséré possède un site de restriction *HindIII* unique dans le gène *mdoH*. Ce site de restriction permettra d'explorer plus précisément la fonction de cette boucle périplasmique.

D'une manière plus générale, l'insertion d'oligonucléotides peut être utilisée pour déterminer les sites permissifs d'une protéine (Betton et coll., 1993 ; Schifferli et Alrutz, 1994). Cette technique peut aussi être employée pour introduire au sein de la séquence protéique un motif antigénique. Ceci a pour but de pouvoir repérer et quantifier plus facilement la protéine étudiée grâce à l'anti-sérum dirigé contre le motif antigénique.

La mise en évidence de l'importance de cette région périplasmique, nous permet de supposer que MdoH peut entretenir des interactions protéine-protéine avec des protéines périplasmiques. Parmi celles-ci, MdoG et MdoB sont des hypothèses séduisantes. En effet, une interaction entre MdoH et MdoB pourrait expliquer la localisation de l'activité de MdoB au niveau de la membrane. Quant à une interaction avec MdoG, elle permet de matérialiser la nécessité pour ces deux protéines d'être synthétisées de concert pour que chacune d'entre elles puisse jouer son rôle. De plus, le fait que la surexpression de la protéine MdoG n'est visualisée (en gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie) que lorsque la protéine MdoH est mutée, nous conduit à penser qu'il existe une

interaction directe entre ces deux protéines. On peut imaginer que cette interaction contraint à limiter la quantité de MdoG. Lorsque MdoH est mutée l'interaction n'existe plus et il n'y aurait plus de limitation de la quantité de MdoG.

Afin de démontrer expérimentalement que ces interactions existent, et plus généralement pour déterminer quelle est, ou quelles sont, la, ou les, protéines qui interagissent avec MdoH, l'insertion d'un épitope (contre lequel on possède un anti-sérum) à différents endroits de MdoH sera d'une grande utilité. En effet, la protéine MdoH contenant cet épitope nous permettra d'effectuer des expériences de pontage chimique afin de tenter d'identifier la ou les protéines qui interagissent avec MdoH.

4°) L'EXTREMITÉ CARBOXYLIQUE EST INDISPENSABLE A L'ACTIVITÉ DE SYNTHÈSE

L'analyse des différentes versions tronquées de MdoH, permet de souligner l'importance de l'extrémité carboxylique dans l'activité. Notamment les 47 derniers résidus faisant partie d'un petit domaine cytoplasmique de 147 résidus. Ce résultat est quelque peu surprenant au regard de l'homologie avec HrpM. En effet, cette homologie devient très faible dans cette région. C'est pourquoi, l'explication la plus raisonnable est de considérer que les différentes versions tronquées provoquent des modifications de conformation. Ainsi, cette région pourrait entretenir une relation conformationnelle avec le domaine central par exemple, ou avec ses résidus voisins, ou encore avec l'ACP ou l'UDP-glucose. En tout état de cause, il paraît peu probable de trouver dans cette région des résidus spécifiquement impliqués dans la réaction réalisant la polymérisation de chaînes de glucose.

5°) RÔLE DES SIX ARGININES CONSECUTIVES

Le séquençage nucléotidique nous avait révélé la présence d'une séquence particulière constituée de six résidus arginines consécutifs. Cette séquence est d'autant plus particulière qu'elle est conservée dans les protéines HrpM de *P. syringae* et OpgB d'*E. chrysanthemi*. Une expérience de mutagenèse dirigée effectuée sur l'un de ces résidus nous a conduit à observer une diminution de la quantité de MDO formée. Nous espérons pouvoir observer une modification de la régulation de la quantité de MDO, car ce type de séquence est très fréquent chez les protéines affines pour l'ADN. Le résultat obtenu nous donne l'occasion de revoir notre a priori sur la fonction possible de cette séquence particulière. En effet, il reste possible que celle-ci soit impliquée dans une interaction de type électrostatique. Vis-à-vis d'une telle région positive, il doit alors se trouver une molécule possédant une région négative. Parmi celles qui sont directement impliquées dans la voie de biosynthèse du MDO on trouve l'UDP-glucose et l'ACP. L'UDP-glucose pourrait mettre en jeu ses

groupes phosphate. Jusqu'à présent, dans la voie de biosynthèse, il n'a pas jamais été mis en évidence un besoin d'énergie autre que celui qui est obtenu par l'hydrolyse de l'UDP-glucose en UMP + glucose. La nécessité d'une source d'énergie comme l'ATP n'a jamais été démontrée. Cependant, le fait que MdoH ne possède pas de séquence homologue aux séquences de Walker et coll. (1982) qui sont reconnues comme les séquences de reconnaissance de l'ATP, plaide en défaveur de l'intervention de l'ATP comme source d'énergie. Quant à l'ACP, il a été démontré que son groupement prosthétique n'était pas impliqué dans la fonction qu'elle remplit dans la voie de biosynthèse du MDO. Il convient donc de considérer la partie protéique de l'ACP, constituée de 77 résidus dont 14 d'acide glutamique et 6 d'acide aspartique. Ces deux acides aminés chargés négativement représentent donc à eux seuls 26% de l'apo-protéine. On peut donc supposer que des résidus acides de l'ACP peuvent participer à des interactions électrostatiques avec la région des six arginines de MdoH.

6°) MdoH EST-ELLE UNE PROTEINE MEMBRANAIRE REGULATRICE ?

A côté de la séquence particulière de 6 arginines, l'intervention de la protéine MdoH dans la régulation osmotique est suggérée par la mutation *mdoA1*. La mutation *mdoA1* ne permet pas la biosynthèse de MDO. Ce défaut de synthèse est supprimé lorsque l'on introduit un plasmide permettant l'expression en *trans* du gène *mdoH*.

Le plasmide pNF252, permettant l'expression d'une protéine de fusion MdoH-LacZ (au niveau de l'acide aminé 25 de MdoH), a été utilisé pour déterminer la régulation osmotique de l'opéron *mdoGH*. Ce plasmide, introduit dans une souche sauvage, ou une souche *mdoG202::neo* ou encore *mdoH200::Tn10*, permet de révéler une activité β -galactosidase 7 fois plus importante à basse qu'à haute osmolarité (Lacroix et coll., 1991). Par contre, introduit dans une souche *mdoA1*, le plasmide pNF252 révèle une activité β -galactosidase plus importante à haute qu'à basse osmolarité (Lacroix, 1989). Il apparaît donc clairement que la mutation *mdoA1* est directement impliquée dans la régulation de l'expression de l'opéron *mdoGH* et que cette mutation n'est pas dominante.

D'autre part, il a été mis en évidence, très récemment, qu'une protéine de fusion MdoG-LacZ (au niveau du codon N°9 de *mdoG*), exprimée à partir du plasmide pNF269, ne permet plus, dans une souche sauvage, une régulation de l'activité β -galactosidase par l'osmolarité du milieu. La seule différence existant entre les plasmides pNF269 et pNF252 est la suppression de la quasi totalité de la phase codante de *mdoG*. Deux hypothèses sont alors admises pour expliquer la différence dans la régulation de l'activité β -galactosidase : soit la phase codante de *mdoG* est le siège d'une régulation, soit la protéine MdoG est impliquée dans cette régulation. Afin de répondre à ces deux hypothèses il sera très prochainement utilisé le plasmide pNF423. Celui-ci possède une séquence de *mdoG* presque

sauvage, puisque seuls 4 nucléotides ont été ajoutés au niveau du site de restriction *Xho*I. Cette modification permet l'arrêt rapide de la traduction, et aboutit à produire une protéine MdoG périplasmique inactive de 75 acides aminés (voir les résultats). Cette mutation replacée dans un plasmide similaire à pNF252 et pNF269 devrait permettre d'écarter l'une des deux hypothèses précédentes. Enfin, placés dans la souche *mdoA1*, ces différents plasmides pourront peut-être nous permettre de préciser la nature de la mutation *mdoA1*.

IV - LES GLUCOSYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DES GPO

Jusqu'à présent, deux types majeurs de glucanes périplasmiques osmorégulés ont été décrits. Les GPO cycliques de 12 à 25 résidus de glucose et les GPO linéaires ramifiés de 8 à 12 unités de glucose. Les GPO cycliques les plus connus sont ceux des Rhizobiacées. Les GPO linéaires ramifiés les mieux étudiés sont ceux d'*E. coli*.

Face à ces différences de structure, il se dégage d'importantes différences dans les voies de biosynthèse de ces GPO. Nous nous intéresserons ici qu'aux différences concernant les glucosyltransférases impliquées dans les étapes précoces de la biosynthèse de ces GPO.

1°) LES GLUCOSYLTRANSFERASES DES RHIZOBIACEES

Il s'agit de protéines localisées dans la membrane cytoplasmique ayant une très haute masse moléculaire (319 kDa). Des expériences *in vitro* montrent que ces protéines sont affines pour l'UDP-glucose et qu'elles peuvent synthétiser des molécules cycliques de plusieurs unités de glucose. Cependant, les produits formés ne présentent pas une structure strictement identique à celles des GPO synthétisés *in vivo*. Les produits ne présentent pas de substitutions et sont de taille un peu plus faible. On notera aussi que l'efficacité de ces systèmes *in vitro* est très supérieure à celle du système mis au point chez *E. coli*. On peut facilement imaginer que ces meilleurs rendements soient dus en partie à la très haute masse moléculaire de ces protéines qui leur confèreraient une stabilité accrue par rapport à celle de protéines de masse moléculaire plus faible. On peut aussi penser que ces protéines, dont on suppose qu'elles réalisent à la fois la reconnaissance de l'UDP-glucose, l'élongation et la translocation de chaînes de glucose à travers la membrane cytoplasmique, soient ainsi avantagées par rapport à un assemblage de protéines requises pour réaliser ces différentes fonctions, comme on peut le supposer pour *E. coli*. Il faut aussi préciser que des mutants *chvA* et *ndvA* accumulent des glucanes dans le cytoplasme, ce qui implique que les protéines ChvA et NdvA (supposées transmembranaires) jouent un rôle prépondérant dans la translocation des GPO.

L'intervention d'une molécule comme l'ACP n'a jamais été décrite pour les Rhizobiacées. Sachant que seule l'apo-protéine de l'ACP est impliquée dans une fonction chez *E. coli*, on peut se demander si une partie des nombreux acides aminés supplémentaires des glucosyltransférases des Rhizobiacées, pourrait remplir une fonction similaire à celle de l'ACP.

Enfin, jusqu'à aujourd'hui aucune topographie de ces protéines n'a été entreprise. Seules les localisations membranaires de ces glucosyltransférases ont été effectuées par des méthodes biochimiques.

2°) LA GLUCOSYLTRANSFERASE MdoH

L'étude rapportée ici, est la première étude topographique d'une glucosyltransférase impliquée dans la biosynthèse de GPO. Elle a permis de mettre en évidence que la majeure partie de cette protéine est située dans le cytoplasme. Le fait que sa masse moléculaire soit plus faible que celle des glucosyltransférases des Rhizobiacées ne signifie pas qu'elle puisse remplir moins de fonctions. Aujourd'hui toutes les fonctions de reconnaissance, d'élongation et de translocation des chaînes de glucose peuvent être attribuées à MdoH.

Très récemment, Roman Efremov a effectué une prédiction de l'organisation membranaire de la protéine NdvB. Celle-ci serait constituée dans sa partie amino-terminale de 8 segments transmembranaires dont les 2 premiers sont séparés des 6 autres par une région d'environ 300 acides aminés. La partie carboxy-terminale de la protéine serait alors cytoplasmique. De plus, la prédiction de structure de la région centrale de NdvB met en évidence qu'elle possède aussi une organisation de type α/β . Enfin, la récente cristallisation d'une UDP-glucosyltransférase soluble d'*E. coli* met en évidence que cette protéine possède aussi une organisation de type α/β (Wedekin et coll., 1995). Ainsi, ces récents résultats nous permettent d'émettre une hypothèse selon laquelle, quelle que soit les espèces bactériennes, les glucosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des GPO nécessiteraient une organisation membranaire similaire, provoquant la localisation dans le cytoplasme d'un domaine présentant une organisation de type α/β .

4 - ANNEXE

ETUDE TOPOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE SPOIIGA DE *BACILLUS SUBTILIS*

I : INTRODUCTION GENERALE

Lorsque se présentent des conditions de vie difficiles, les bactéries peuvent avoir recours à différents systèmes de survie. Le plus résistant est sans aucun doute la formation de spores, dont la durée de vie peut atteindre plusieurs centaines d'années. La plupart du temps en réponse à un appauvrissement nutritif du milieu, la bactérie à Gram positif, *Bacillus subtilis*, a la possibilité de sporuler (pour une revue récente voir Errington, 1993).

Dans un milieu de croissance suffisant pour *B. subtilis*, toutes les cellules, appelées cellules végétatives, se divisent centralement pour donner deux cellules filles identiques. Par contre, dès que le milieu va s'épuiser, cette population ne pourra plus croître de façon exponentielle, et va alors se subdiviser en deux sous-populations : d'une part, les cellules qui vont entrer dans le processus de sporulation, et d'autre part, les cellules qui demeureront des cellules végétatives. L'entrée en sporulation implique des changements majeurs de la morphologie, de la physiologie, et de la biochimie de la cellule. En premier lieu, ce sont les changements morphologiques qui ont été étudiés il y a plus de trente ans (Ryter, 1965). En effet, des mutants asporogènes présentent différents aspects morphologiques. Ainsi, sept états de transition durant la sporulation ont été définis par la simple observation (Figure 41, page 126). La formation de la spore débute en fin de phase exponentielle, au temps appelé T_0 (Stade 0). Dans les conditions de laboratoire, elle dure en moyenne 7 à 10 heures, et s'achève au temps T_7 par la libération d'une spore libre. Aux temps $T_{1,5}$ à T_2 la cellule s'est partagée en deux compartiments par invagination de la membrane plasmique afin de former un septum, dépourvu de paroi et proche d'un pôle de la cellule. La formation complète du septum définit le stade II et il faut noter que tant que cette formation n'est pas complète, la mise en place de la sporulation reste réversible. Par la suite la préspore est entièrement engouffrée à l'intérieur de la cellule mère, au temps $T_{3,5}$. Ceci définit le stade III. Durant les étapes suivantes la préspore s'entoure de couches de peptidoglycane, pour former le cortex (stade IV), puis de protéines de tunique qui enveloppent le cortex (stade V). Enfin, aux temps T_6 à T_7 la spore renforce sa capacité de résistance (à la chaleur, aux solvants organiques, aux radiations...) et finit par être

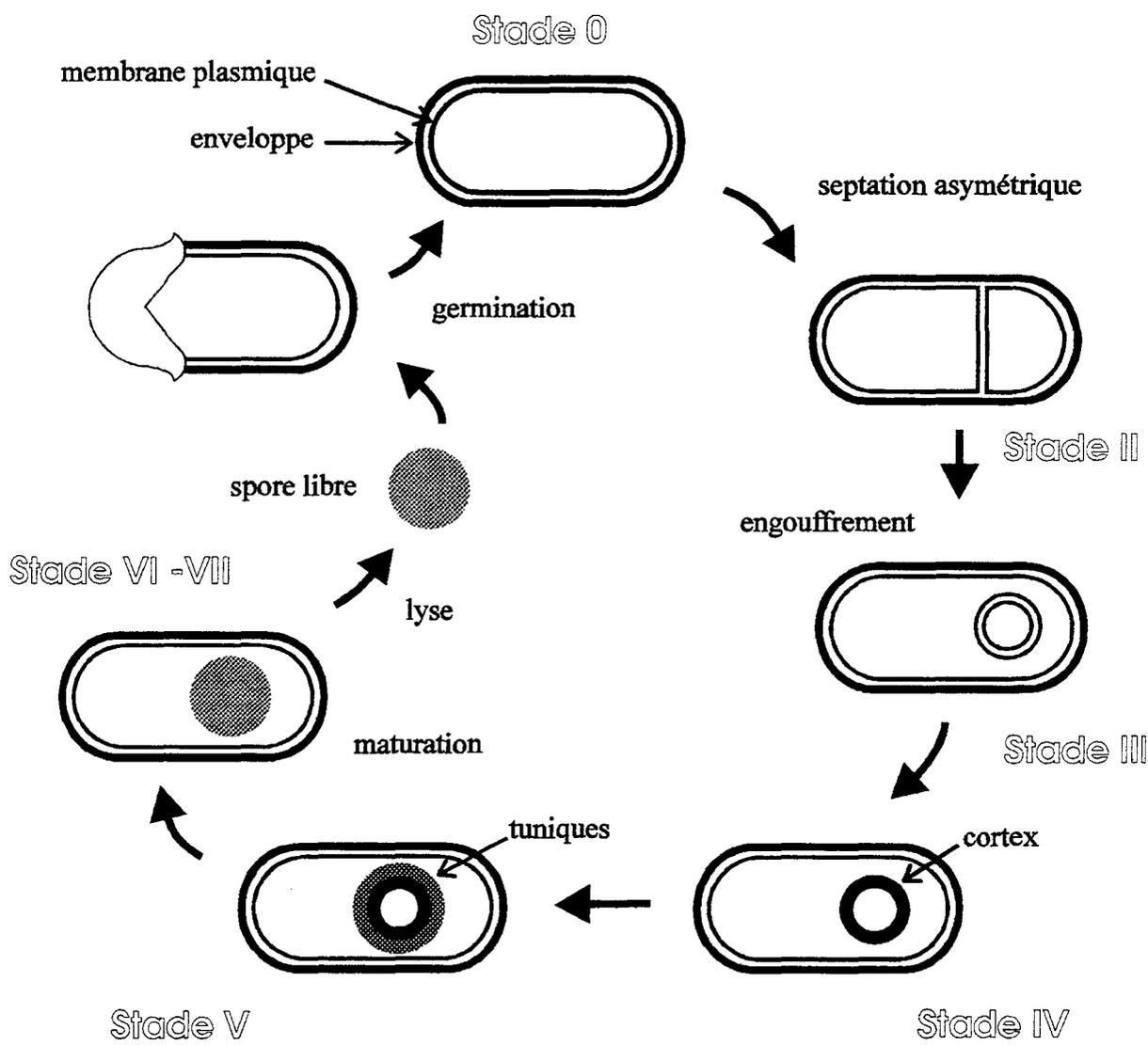


Figure 40 : Cycle de la sporulation de *Bacillus subtilis*

libérée lors de la lyse de cellule mère (stades VI-VII).

Ces dernières années, les progrès effectués dans les domaines de la génétique, de la biologie moléculaire et de la biochimie ont permis de lever le voile sur une partie des mécanismes mis en jeu lors de la sporulation. Il est maintenant établi que le déroulement de la sporulation passe par un contrôle temporel et spatial de l'expression de plus de 100 gènes. Le contrôle de ces gènes est soumis à l'intervention de quelques facteurs sigma spécifiques, au nombre de 5 à ce jour, dont l'expression dépend des différentes informations que la cellule met en place au fur et à mesure de la sporulation (Losick et Stragier, 1992).

L'une des clefs du développement de la sporulation réside dans la formation d'un septum asymétrique, dépourvu de matériel pariétal, qui divise la cellule en deux compartiments : la préspore et la cellule mère. Ces deux compartiments, bien qu'héritant d'un chromosome identique venant de la dernière réplication de la cellule végétative, vont suivre des voies divergentes conduisant à une différenciation cellulaire. Au-delà de la quantité de protéines nécessaires à cette différenciation, la difficulté de son étude vient des différents niveaux de régulation mis en place pour contrôler l'expression des gènes. Parmi ces différents niveaux, l'intervention des facteurs sigma permettant le contrôle de l'ARN-polymérase, est au centre des études menées actuellement (pour une revue récente voir Haldenwang, 1995).

II : REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DURANT LA SPORULATION

A) DE L'INITIATION A LA SEPTATION

1°) LA DECISION DE SPORULER

La formation de la préspore requiert l'intégration de signaux internes et externes, incluant les signaux nutritionnels, la densité de population et le cycle cellulaire.

La limitation des sources de carbone, d'azote ou de phosphore peut induire la sporulation. Cette limitation de nutriments conduit à une chute de la concentration intracellulaire de guanidine triphosphate (GTP). Réciproquement, des conditions de diminution de la concentration de GTP peuvent conduire les cellules à sporuler, bien qu'elles soient en présence d'un excès de nutriments (Lopez et coll., 1979). Ainsi, la décision de sporuler, suite à un signal nutritionnel passe par la concentration de GTP, mais à ce jour on ne connaît pas encore les mécanismes précis permettant de lier la concentration de GTP à la transcription de gènes. Cependant, il a été montré récemment que la protéine Obg, protéine affine pour le GTP, est requise pour stimuler le système dit de phospho-relais (voir plus loin), système nécessaire à l'activation de la protéine Spo0A (Vidwans et coll., 1995).

Des cellules maintenues dans des conditions de faible densité de population entrent très rarement en sporulation. Par contre, dès que la densité de population devient importante, la sporulation se développe normalement (Grossman et Losick, 1988). Il semble que les cellules végétatives en condition de croissance produisent une substance nécessaire à une sporulation efficace. Ce facteur, appelé provisoirement EDF-1 (pour Facteur de Différenciation Extracellulaire-1), serait d'origine oligopeptidique. Son expression dépend de plusieurs gènes *spo0* (Perego et coll., 1991, Rudner et coll., 1991). Actuellement, des études sont en cours pour préciser comment la cellule perçoit ce facteur et comment elle interprète cette information.

Il est maintenant établi que le cycle cellulaire et l'entrée en sporulation sont étroitement liés (Mandelstam et Higgs, 1974). Mais ici aussi, on ne connaît pas les mécanismes utilisés par la cellule pour transmettre cette information à l'appareil transcriptionnel.

2°) LA REGULATION DE L'INITIATION DE LA SPORULATION

Dans les cellules végétatives les gènes sont transcrits majoritairement par l'ARN-polymérase contenant le principal facteur sigma, σ^A (équivalent au σ^{70} d'*E. coli*), et très faiblement par l'ARN-polymérase contenant un facteur sigma secondaire, σ^H (codé par *spo0H*). Les gènes *spo* ne sont pas tous actifs pendant la phase de croissance, mais ils sont tous impliqués dans les mécanismes nécessaires à la transition de la croissance à la sporulation. Deux régulateurs transcriptionnels, σ^H et Spo0A, jouent un rôle clef dans l'initiation de la sporulation.

Dans les cellules en phase de croissance, le facteur σ^H est faiblement exprimé. Le gène *spo0H*, transcrit par l'ARN-polymérase contenant le facteur σ^A , voit son expression augmenter graduellement et atteindre un maximum au moment de la phase stationnaire (Weir et coll., 1991). Cependant, les gènes contrôlés par le facteur σ^H ne sont pas exprimés avant le déclenchement de la sporulation. Il existe donc des mécanismes de contrôle post-transcriptionnel du facteur σ^H , mécanismes qui restent encore inconnus. Parmi les gènes contrôlés par le facteur σ^H , je ne citerais que le plus important dans l'initiation de la sporulation : le gène *spo0A*.

Le gène *spo0A* peut être transcrit par deux promoteurs : Pv et Ps. Le promoteur Pv est reconnu par l'ARN-polymérase contenant le facteur σ^A . Ceci permet d'avoir un niveau de base dans les cellules végétatives. Le promoteur Ps est reconnu par l'ARN-polymérase contenant le facteur σ^H , ce qui permet d'obtenir rapidement une très grande quantité de protéine Spo0A, dès le début de la sporulation. Pour être active la protéine Spo0A doit être phosphorylée. Cette phosphorylation est l'aboutissement d'une suite d'événements débutant par l'intégration d'un signal de l'initiation de la sporulation. Ce signal est relayé par un système de phosphorylations et déphosphorylations

successives de protéines appelé : phospho-relais (Figure 42, page 130, Burbulys et coll., 1991). En premier lieu, la protéine KinA (codée par *spoIIIJ*) s'autophosphoryle en réponse à des signaux (encore inconnus), puis elle se déphosphoryle au profit de Spo0F, qui elle-même se déphosphoryle au profit de Spo0B et Spo0B se déphosphoryle à son tour en phosphorylant Spo0A. Ainsi phosphorylée Spo0A devient un facteur de transcription qui peut réguler positivement ou négativement une grande variété de gènes. Parmi ceux-ci, trois opérons clefs spécifiques de la sporulation, *spoIIA*, *spoIIIE* et *spoIIIG* sont régulés d'une manière positive.

De nombreuses protéines interviennent, secondairement, dans la régulation de l'initiation de la sporulation. Ces protéines sont souvent impliquées dans le contrôle de différentes réponses mises en place pendant la phase post-exponentielle de croissance. Il s'agit entre autres du développement de la compétence génétique et de la sécrétion de protéases et d'antibiotiques extracellulaires.

La protéine AbrB (codée par *abrB*) est une protéine affine pour l'ADN qui régule négativement l'expression de différents gènes (Strauch et coll., 1989). Parmi ceux-ci citons *spo0E*, *spo0H*, *spoVG* et *abrB*. Le niveau de la protéine AbrB est élevé dans les cellules végétatives jusqu'au moment où la sporulation débute. En effet, Spo0A étant le répresseur du gène *abrB*, dès que le niveau de Spo0A augmente le niveau de AbrB diminue.

Comme *abrB*, *hpr* code une petite protéine affine pour l'ADN (Perego et Hoch, 1988). Elle régule l'expression de gènes codant des enzymes extracellulaires et sa surexpression conduit à une inhibition de la sporulation.

Enfin la protéine Sin, nécessaire à l'expression de différents gènes impliqués dans la compétence et dans la mobilité, est affine pour des séquences d'ADN des opérons *spoIIA*, *spoIIIE* et *spoIIIG*. Elle régulerait négativement ces opérons dans le but de retarder leur expression jusqu'à la septation asymétrique. Elle pourrait aussi permettre à la cellule d'annuler l'entrée en sporulation lorsque les conditions nutritionnelles ne seraient plus limitantes (Mandic-Mulec et coll., 1992).

3°) LA MISE EN PLACE DE LA SEPTATION

Le premier signe morphologique de la mise en place de la sporulation est la formation d'un septum asymétrique qui donne une délimitation physique à la préspore (Figure 41, page 126). Puisque le septum de la préspore provient probablement d'un septum en formation d'une cellule végétative, il est raisonnable de penser que quelques-unes des protéines sont communes à la formation des deux types de septums. De plus, il est nécessaire de faire appel à d'autres protéines telles que les produits des gènes *ftsA*, *ftsZ* et *spoIIIE*. Les produits de l'opéron *spoIIIE* sont exprimés

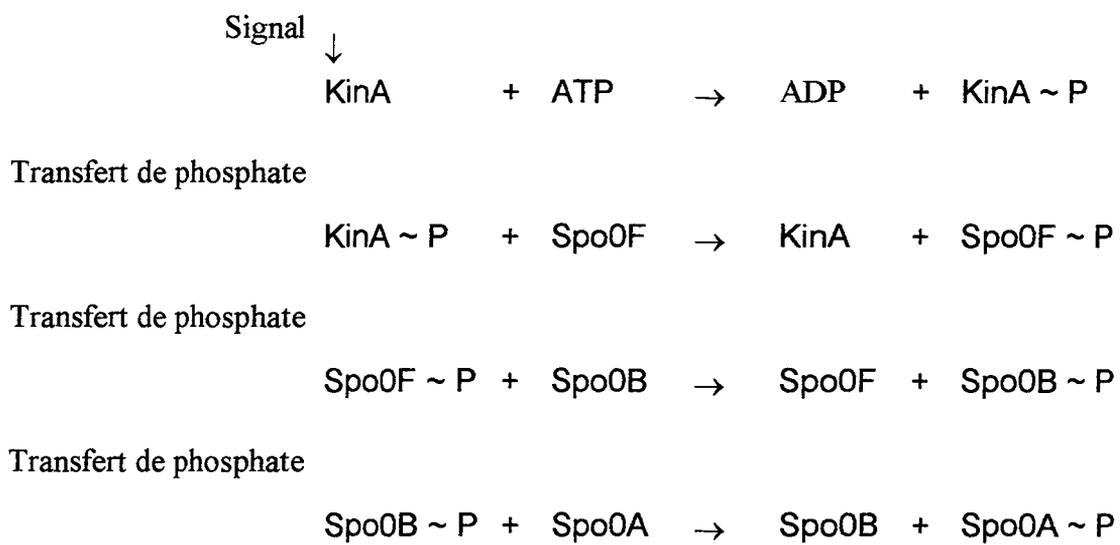


Figure 41 : Mécanisme simplifié de la phosphorylation de la protéine Spo0A par le système dit de phospho-relais.

juste avant la septation et interféreraient avec l'appareil général de formation du septum afin de conduire à la mise en place du septum asymétrique (Youngman, 1992, cité dans Errington, 1993).

La septation finit donc par créer deux compartiments cellulaires, la cellule mère et la présore, au sein de la même cellule. Dans chacun des compartiments les objectifs à atteindre seront différents, mais le but sera identique : tout mettre en oeuvre pour permettre la formation d'une spore mature.

B) ETABLISSEMENT DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES

Une fois que la présore est complètement formée à l'intérieur de la cellule mère, il devient nécessaire de mettre en place un système de communication entre ces deux compartiments. Aujourd'hui, la nature exacte des messages n'a pas encore été précisée, bien que leur présence aient été rendue indispensable à l'explication de l'expression différentielle des gènes.

Actuellement il est démontré que les deux compartiments évoluent différemment grâce à l'intervention de quatre facteurs sigma spécifiques : σ^E et σ^K dans la cellule mère, et σ^F et σ^G dans la présore. En ce qui concerne les facteurs σ^G et σ^K , il a été démontré que leur expression est uniquement localisée dans leur compartiment spécifique et n'a lieu que pendant les étapes tardives de la sporulation. Mais à propos des facteurs σ^E et σ^F , les gènes les codant sont exprimés dans la cellule avant la septation. L'une des questions les plus intéressantes est ainsi posée : comment ces deux facteurs sigma ne sont actifs que dans un seul des deux compartiments ?

1°) LE CONTROLE DE L'ACTIVITE DE σ^F

L'opéron *spoIIA* est constitué de trois gènes : *spoIIAA*, *spoIIAB* et *spoIIAC*. Ce dernier code le facteur σ^F et son expression est contrôlée par les protéines SpoIIAA et SpoIIAB (Figure 43, page 132). SpoIIAB est un facteur anti-sigma qui inhibe l'expression du gène *spoIIAC*. SpoIIAA est une protéine antagoniste de SpoIIAB. Les produits de l'opéron *spoIIIE* prennent part aussi à la régulation de l'expression de *spoIIAC*. En fait, dans la cellule préseptationnelle le gène *spoIIAC* peut être transcrit mais il reste « silencieux » à cause de l'action de SpoIIAB. Après la formation du septum (stade II), la protéine SpoIIAA est exprimée dans la présore (par l'intermédiaire des produits de l'opéron *spoIIIE*) et en jouant son rôle d'antagoniste, elle va permettre une expression spécifique du facteur σ^F (Figure 43, page 132 ; Margolis et coll., 1991). Comment les produits de l'opéron *spoIIIE* permettent-ils de rendre active, spécifiquement dans la présore, la protéine SpoIIAA ? Aujourd'hui, aucune réponse définitive n'a été apportée. Toutefois, il semble probable que les produits de l'opéron *spoIIIE* interviennent dans un système de transmission d'une information extérieure aboutissant à l'action de SpoIIAA (Margolis et coll., 1991).

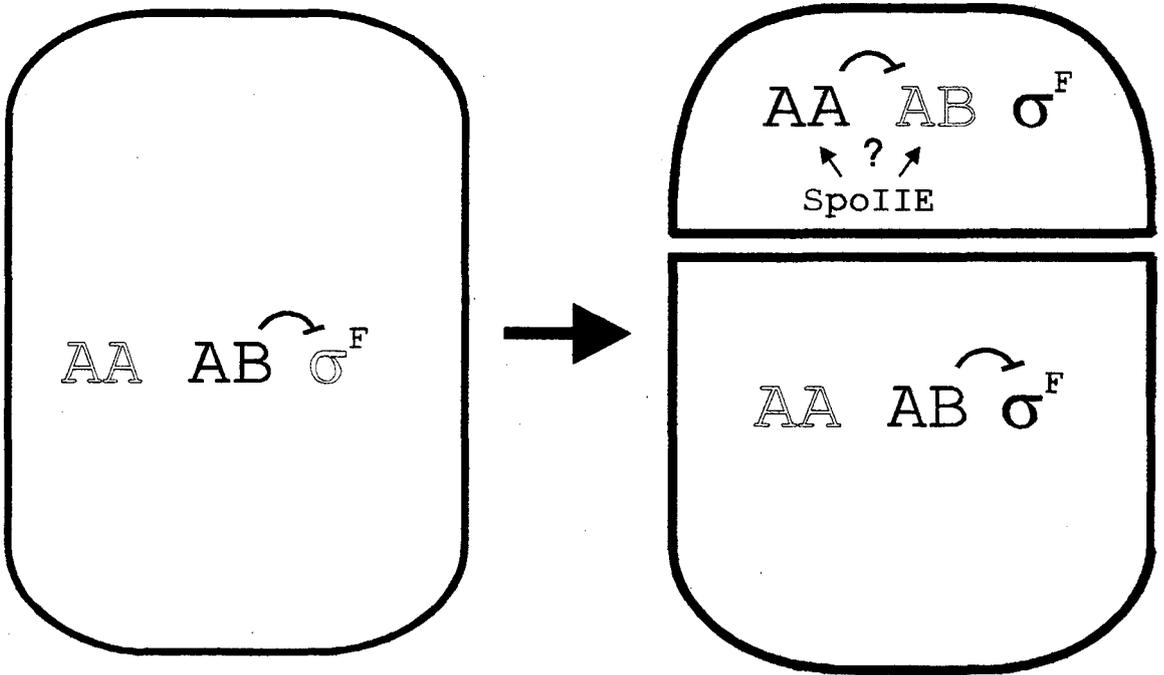


Figure 42 : Mécanisme simplifié du contrôle de l'activité de σ^F

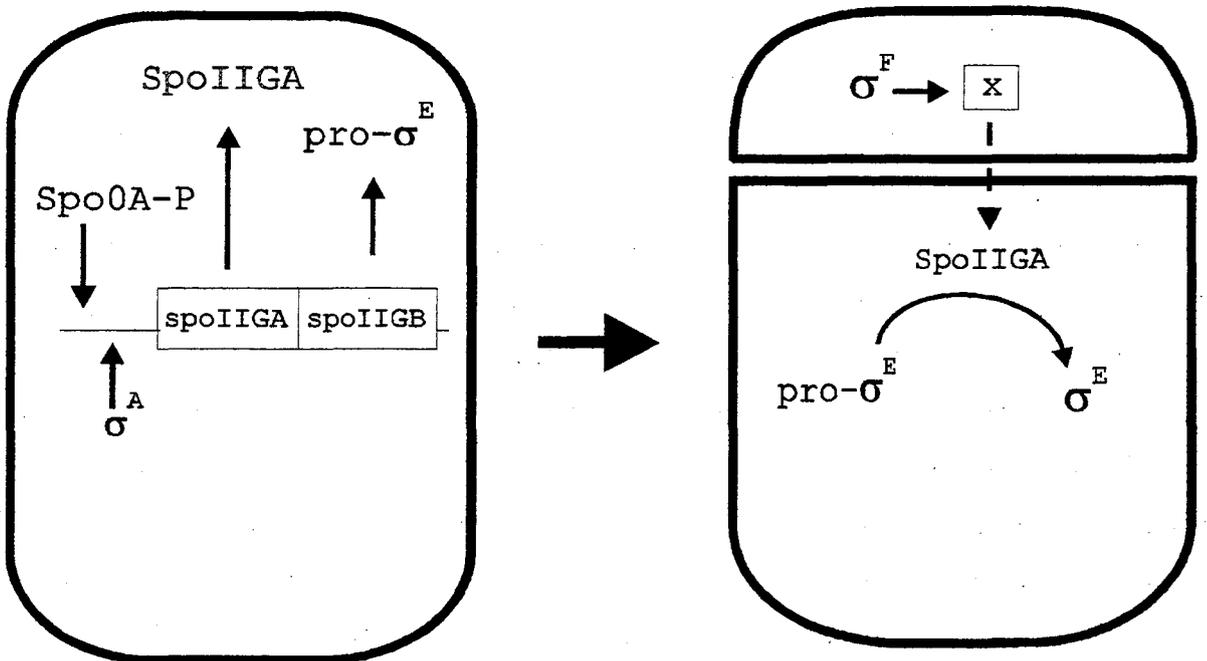


Figure 43 : Mécanisme simplifié du contrôle de l'activité de σ^E

Il est important de noter que le facteur σ^F est absolument nécessaire à l'expression du gène *spoIIIG* codant le facteur σ^G .

2°) LE CONTROLE DE L'ACTIVITE DE σ^E

L'opéron *spoIIG* est constitué de deux gènes : *spoIIGA* et *spoIIGB* (encore appelé *sigE*). Le gène *spoIIGB* conduit à la synthèse d'une protéine pro- σ^E inactive (Figure 44). L'activation de pro- σ^E en σ^E serait catalysée par la protéine SpoIIGA (Jonas et coll., 1988 ; Peters et Haldenwang, 1994). Il a été montré que la maturation de pro- σ^E n'avait lieu que dans la cellule mère et était dépendante de l'expression du facteur σ^F (Stragier et coll., 1988). Comment le facteur σ^F peut-il diriger la maturation du facteur σ^E uniquement dans la cellule mère ? Ici aussi aucune réponse n'a encore été apportée, mais il semble que le facteur σ^F puisse permettre la synthèse d'un ou de plusieurs produits impliqués dans la maturation de pro- σ^E (Shazand et coll., 1995). Parmi ceux-ci, un ou plusieurs véhiculeraient vers la cellule mère l'information nécessaire à l'activation de la protéase SpoIIGA supposée être dans la(les) membrane(s) du septum (Figure 44).

Enfin, le facteur σ^E est requis pour l'expression du gène *spoIIID* qui code un facteur de transcription nécessaire à l'expression du facteur σ^K .

C) DU STADE II A LA SPORE LIBRE

1°) DU STADE II AU STADE III

A la suite de la septation, la préspore va peu à peu s'inclure à l'intérieur de la cellule mère (Figure 41, page 126). Durant l'inclusion les facteurs σ^F et σ^E vont permettre l'expression de gènes nécessaires à la poursuite de la sporulation. Il paraît évident qu'au cours de cette étape, les protéines nécessaires aux échanges informatifs entre la cellule mère et la préspore seront mises en place.

Bien que pouvant déjà être transcrits, les gènes *spoIIIG* et *sigK* (codant respectivement les facteurs σ^G et σ^K) ne permettent pas l'expression de produits actifs. En effet, ce n'est que lorsque l'inclusion est achevée que le facteur σ^G devient actif (la cellule entre alors dans les phases tardives de la sporulation). Ceci signifie donc qu'il existe une relation étroite entre les changements morphologiques de la cellule et la régulation de l'expression des gènes.

2°) LA PHASE TARDIVE DU DEVELOPPEMENT DE LA PRESPORE

L'expression du gène *spoIIIG* est directement dépendante du facteur σ^F mais aussi indirectement du facteur σ^E . En effet, des mutants de l'opéron *spoIIG* sont incapables de produire le facteur σ^G . Partridge et Errington (1993) ont ainsi émis l'hypothèse que le facteur σ^E gouvernerait

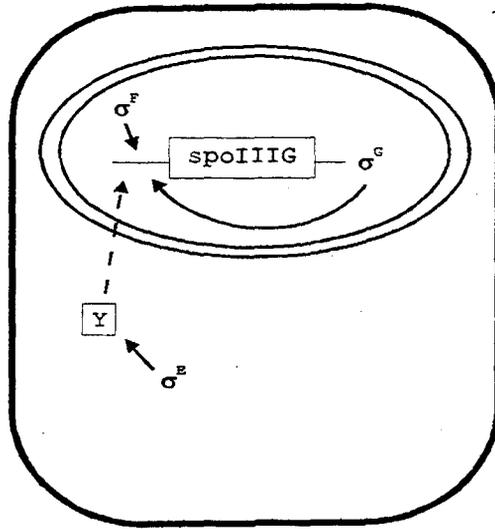


Figure 44 : Mécanisme simplifié de la régulation de l'expression de σ^G

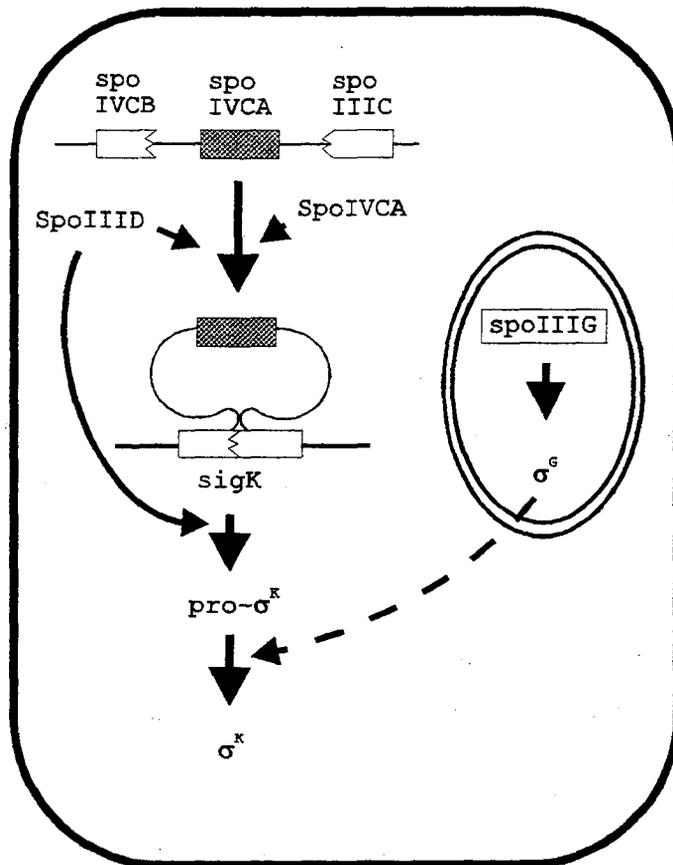


Figure 45 : Mécanisme simplifié de la régulation de l'expression de σ^K

l'expression d'un gène Y, dont le produit est dirigé vers la préspore et dont la fonction serait de « débloquer » la transcription de *spoIIIG* (Figure 45). Par la suite le gène *spoIIIG* s'autorégule positivement.

Parmi les nombreux gènes dont l'expression dépend du facteur σ^G , on trouve notamment un grand nombre de gènes *ssp* (pour small s particles) et *ger* (gènes impliqués dans la germination).

3°) LA PHASE TARDIVE DANS LA CELLULE MÈRE

L'apparition du facteur σ^K actif est l'aboutissement d'un processus en trois étapes (Figure 46). La première étape consiste en un réarrangement chromosomique permettant la formation du gène composite *sigK*. Ce gène est donc constitué de la partie 5' du gène *spoIVCB* joint en phase à la partie 3' du gène *spoIIIC* (Stragier et coll., 1989). Ce réarrangement est catalysé par le produit du gène *spoIVCA*, gène situé à l'intérieur de l'élément chromosomique excisé. Puis, la deuxième étape aboutit à l'expression du gène *sigK* donnant naissance à la protéine pro- σ^K inactive. Enfin la dernière étape permet l'obtention du facteur σ^K actif par l'action d'une protéase dont la nature n'a pas encore été précisée (Kunkel, 1991).

La régulation de l'expression et de l'activité de σ^K est l'une des plus complexes car à chaque étape il existe un ou plusieurs éléments régulateurs (Figure 46). Tout d'abord, la recombinase SpoIVCA ne s'exprime que dans la cellule mère. Puis, le promoteur du gène *sigK* (qui est le même que *spoIVCB*) est reconnu par l'ARN-polymérase contenant le facteur σ^E . Au cours de ces deux étapes, le produit du gène *spoIIID* intervient comme un élément régulateur. Enfin, la maturation de pro- σ^K n'a lieu que lorsqu'un signal dépendant du facteur σ^G passe de la préspore à la cellule mère. Ce signal pourrait impliquer le gène *spoIVB* et l'opéron *spoIVF* dont les expressions sont dépendantes de σ^G (Lu et coll., 1990). En effet, des mutations dans les gènes *spoIVB* et *spoIVFB* empêchent la maturation de pro- σ^K . Il a été proposé par Cutting et coll. (1991) que SpoIVFB serait la protéase responsable de la maturation de pro- σ^K et que SpoIVFA en serait un inhibiteur nécessaire au contrôle de l'activité de SpoIVFB. Ces protéines ayant des caractéristiques hydrophobes, elles pourraient être membranaires et entrer en interaction avec la protéine SpoIVB. Cette dernière posséderait des caractéristiques proches de celles d'une lipoprotéine (Van Hoy et coll., 1990), ce qui lui permettrait ainsi d'être attachée à la membrane cytoplasmique et d'être localisée entre les deux membranes de la préspore.

Parmi les gènes qui sont exprimés via le facteur σ^K , on retrouve la plupart des gènes nécessaires à la formation du cortex et des tuniques. Ces derniers éléments procureront une

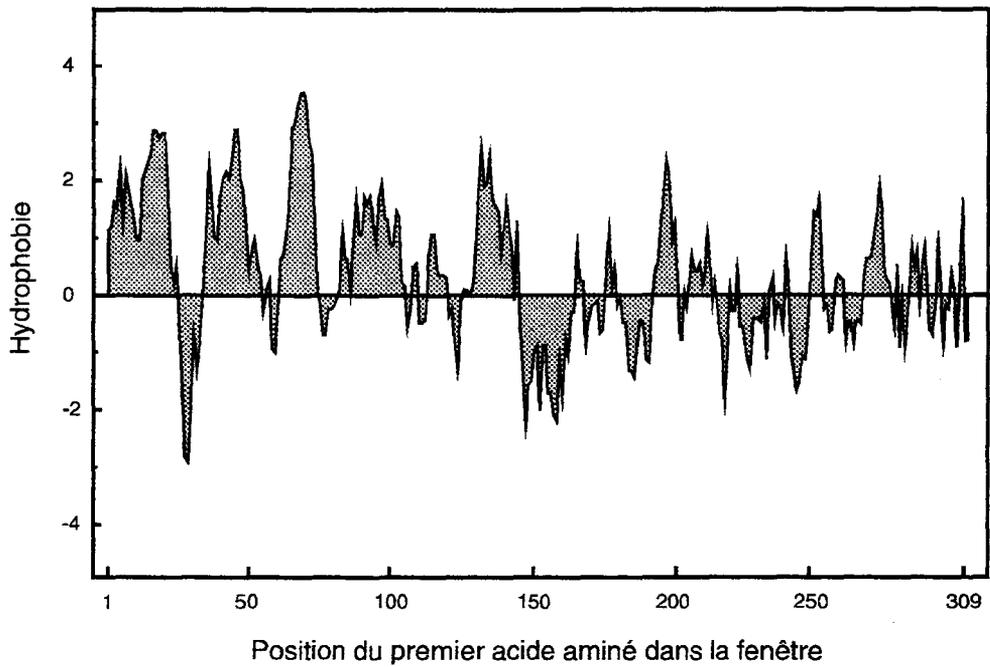


Figure 46 : Profil d'hydrophobie de la protéine SpoIIIGA d'après les valeurs de Kyte et Doolittle (1982)

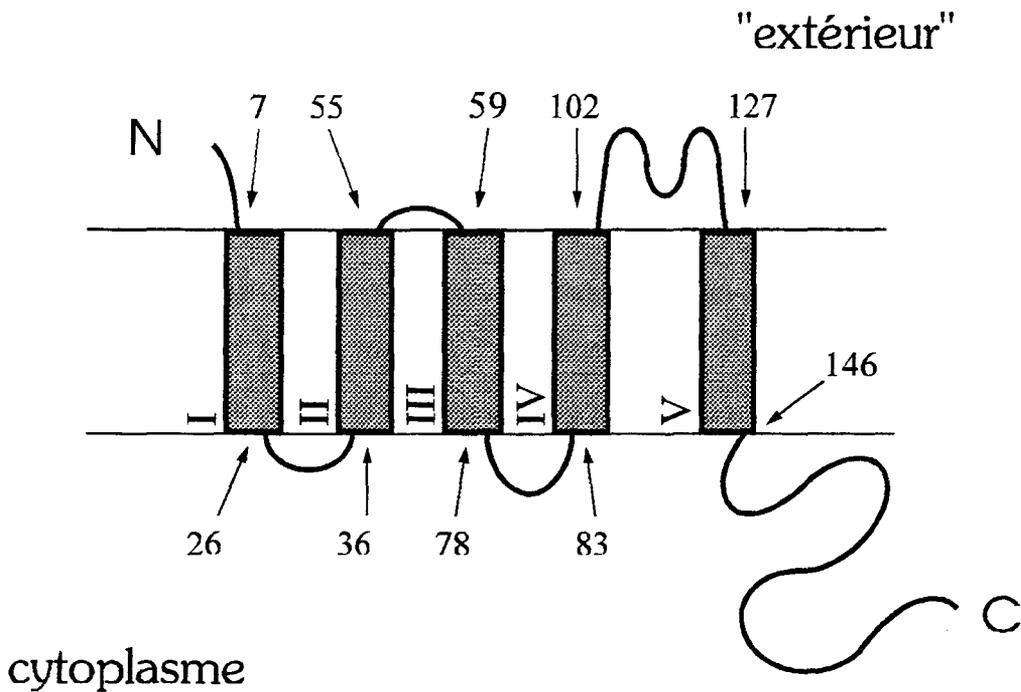


Figure 47 : Topographie de la protéine SpoIIIGA proposée par Stragier et coll., (1988)
 Les numéros indiquent la position des acides aminés situés aux limites des segments
 Les chiffres romains représentent les numéros des segments transmembranaires
 L'« extérieur » correspond à l'espace situé entre les membranes cytoplasmiques de la préspore et de la cellule mère

protection à la spore qui sera alors libérée dans le milieu par la lyse de la cellule mère (Figure 40, page 126).

III : ANALYSE TOPOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE SPOIIGA

A) LE GÈNE *spoIIGA* ET SON PRODUIT

1°) Le gène *spoIIGA*

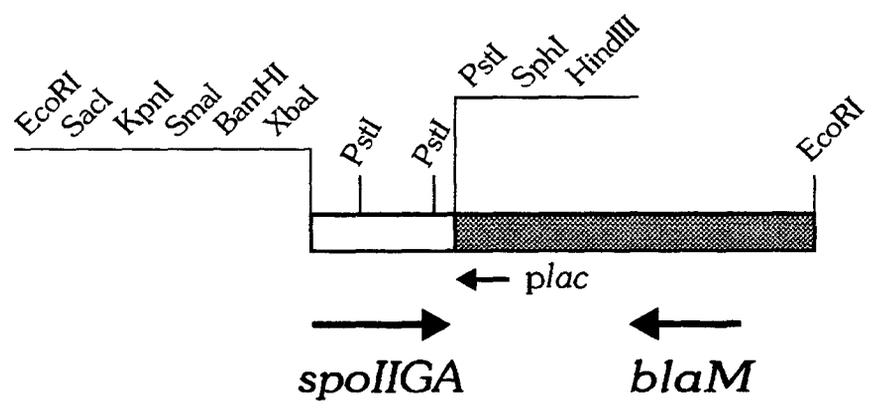
Le gène *spoIIGA* est le premier des deux gènes de l'opéron *spoIIG*. Son expression est placée sous le contrôle du facteur σ^A et du facteur de transcription Spo0A phosphorylé, et commence environ une heure après le début de la sporulation. Ce gène a été séquencé et il permet l'expression d'une protéine de 309 acides aminés (Masuda et coll., 1990). Une région intergénique de 65 nucléotides sépare le dernier codon de *spoIIGA* et le premier de *spoIIGB*.

2°) La protéine SpoIIGA

Le profil d'hydrophobie de SpoIIGA est présenté sur la figure 47. A partir de ce profil et d'autres données prédictives, Stragier et coll. (1988) ont proposé que la protéine SpoIIGA soit insérée dans la membrane grâce à 5 segments transmembranaires (Figure 48). L'hypothèse selon laquelle SpoIIGA est une protéine membranaire a été confirmée par Peters et Haldenwang (1991). Ces auteurs ont utilisé une protéine de fusion SpoIIGA-LacZ (au niveau de l'acide aminé 306) pour déterminer la localisation de SpoIIGA. L'expérience suivante a été réalisée : des cellules en cours de sporulation (stade III), ont été lysées avec précaution (en présence et en absence d'une concentration finale en Triton X-100 de 2%), puis centrifugées à 30000g pendant 30 min. L'activité β -galactosidase a été mesurée dans les différentes fractions. En l'absence de Triton X-100, il y a 2 fois plus d'activité dans le culot que dans le surnageant, alors qu'en présence de Triton X-100, il y a 3,5 fois moins d'activité dans le culot. La localisation membranaire de SpoIIGA serait donc sensible à la présence de Triton X-100 (Peters et Haldenwang, 1991).

Depuis cette expérience, aucune autre preuve de la localisation membranaire de la protéine SpoIIGA n'a été apportée. De même, il n'a jamais été entrepris d'analyse topographique pouvant préciser le nombre et la position des différents segments transmembranaires. Cette protéine est pressentie pour jouer un rôle dans la transmission d'un signal de la présore à la cellule mère. Il devenait donc très intéressant de préciser sa topographie, afin de mieux entreprendre la mise à jour du mécanisme précis de la transmission d'une information par cette protéine membranaire.

pDG 181



pNF 426

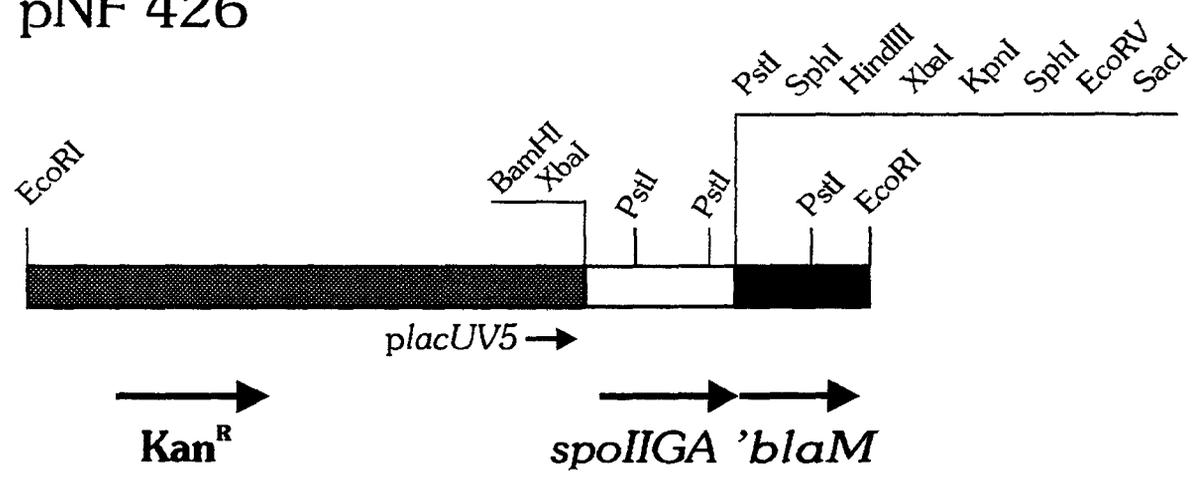


Figure 48 : Cartes des plasmides utilisés pour l'étude topographique de la protéine SpoIIIGA

B) L'ETUDE TOPOGRAPHIQUE

1°) CONSTRUCTION DE FUSIONS ALEATOIRES AVEC LA β -LACTAMASE

a) Réalisation du plasmide nécessaire aux délétions

Le plasmide pDG181 fourni par le Dr P. Stragier a été coupé par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III (Figure 49). Le fragment contenant le gène *spoIIGA* a été placé dans le plasmide pNF150 préalablement coupé par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Le plasmide ainsi obtenu (pNF426) place le gène *spoIIGA* en aval du promoteur *placUV5* et en amont de la version tronquée du gène *blaM* (Figure 49).

b) Réalisation des délétions à l'exonucléase III

La technique utilisée pour effectuer les délétions à partir du plasmide pNF426 est décrite dans la fiche technique N°4.

Un total de 6 fusions aléatoires a été obtenu. Elles se situent au niveau des acides aminés 3, 112, 117, 129, 272 et 306. Toutes ces fusions ne permettent pas aux cellules qui les expriment de croître en colonies isolées. Malgré plusieurs tentatives, il n'a jamais été possible d'isoler une fusion ayant un phénotype périplasmique. De même, je n'ai jamais réussi à obtenir des fusions aléatoires entre les acides aminés 3 et 112, c'est à dire dans la région où sont prédits plusieurs segments transmembranaires. Cependant, ces premiers résultats permettait de contester le modèle établi. En effet, ce modèle propose une boucle d'acides aminés entre les segments IV et V qui est située à « l'extérieur ». Ainsi, les fusions aux niveau des acides aminés 112, 117 et 129 devraient présenter un phénotype périplasmique. Ce phénotype n'étant pas observé il faut en conclure que le segment V n'existe pas. De même, la localisation de l'extrémité carboxylique étant cytoplasmique il nous faut aussi contester l'orientation des 4 autres segments. Ceux-ci seraient donc tous dans une orientation inverse à celle proposée.

2°) REALISATION D'UNE FUSION CIBLEE AVEC LA β -LACTAMASE

Afin de préciser la topographie de l'extrémité aminée j'ai choisi d'effectuer une fusion avec la β -lactamase en employant le site de restriction *Nhe*I. Ce site se situe au niveau du 195ème nucléotide correspondant à l'acide aminé 65. Cette position correspond à une région prédite entre les segments II et III du modèle proposé, région qui devrait être située à « l'extérieur ». Pour réaliser cette fusion j'ai effectué une coupure du plasmide pNF426 par l'enzyme *Nhe*I, et j'ai rendu les extrémités franches en employant le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I. Puis j'ai effectué une deuxième coupure par l'enzyme *Bam*HI. Le fragment contenant la région 5' du gène *spoIIGA* a été inséré dans le plasmide pNF150 préalablement coupé par les enzymes *Xba*I (dont les extrémités ont

été rendues franches) et *Bam*HI. Le plasmide ainsi construit permet l'expression d'une protéine de fusion qui ne confère pas aux cellules une résistance individuelle à l'ampicilline.

Ce résultat impliquait une nouvelle remise en cause du modèle proposé. Il nous fallait donc être sûr que cette protéine de fusion provoquait la localisation de la partie β -lactamase dans le cytoplasme grâce aux caractéristiques de la partie de SpoIIIGA, et non à cause d'une mauvaise orientation due, soit à la présence ou à la disparition de résidus chargés, soit à une conformation défavorable à l'expression de l'activité β -lactamase ou à la stabilité de la protéine de fusion. L'examen de la nature des nouveaux acides aminés aux alentours du point de fusion ne fait apparaître aucun changement significatif dans la répartition des charges. En aucun cas, les changements effectués ne peuvent permettre de remettre en cause la stabilité des deux premiers segments proposés.

Enfin, pour essayer de déterminer si la conformation particulière du point de fusion serait défavorable, j'ai inséré un oligonucléotide de 12 paires de bases au niveau du site *EcoRV* situé 18 nucléotides en aval du point de fusion, dans le but de perturber la topographie locale du point de fusion. Plusieurs clones ayant inséré une ou plusieurs copies de cet oligonucléotide ont été obtenus. Aucun d'entre eux ne présente un phénotype périplasmique. Il convient donc de conclure que la fusion au niveau de l'acide aminé 65 est localisée dans le cytoplasme.

Devant les résultats de ces différentes fusions le modèle proposé n'est plus valide. Il devient nécessaire d'en proposer un autre. C'est pourquoi j'ai effectué le dosage de l'activité β -lactamase de plusieurs protéines de fusion afin de confirmer la localisation membranaire de ces protéines hybrides.

3°) DOSAGES DES ACTIVITES β -LACTAMASE DES PROTEINES DE FUSION

a) Dosages chez *E. coli*

J'ai choisi de doser l'activité de 3 protéines de fusion situées au niveau des acides aminés 65, 129 et 306. La technique utilisée est décrite dans la fiche technique N°4. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant.

site de la fusion	activité β -lactamase (unités arbitraires)		
	surnageant	culot	total
AA N°65	21,4 (82 %)	4,6 (18 %)	26
AA N°129	88,3 (92 %)	7,7 (8 %)	96
AA N°306	74,6 (91 %)	7,4 (9 %)	82

Ces résultats montrent sans aucune ambiguïté que les trois protéines de fusion ne sont pas localisées dans la membrane cytoplasmique d'*E. coli*. Ceci va à l'encontre des résultats de Peters et

Haldenwang (1991). Toutefois, leurs expériences avaient été mené chez *B. subtilis*. Bien que l'insertion des protéines membranaires de *B. subtilis* chez *E. coli* s'effectue en respectant la conformation active de celles-ci (voir par exemple Tolner et coll., 1995), nous n'étions pas à l'abri d'un cas particulier où l'insertion de SpoIIIGA serait spécifique de *B. subtilis*. Ainsi, afin de confirmer ou d'infirmer nos résultats, nous avons demandé au Dr P. Stragier d'introduire ces trois fusions de gène dans des souches de *B. subtilis*.

b) Dosages chez *B. subtilis*

Les trois gènes de fusion ont été placé en copie unique sur le chromosome de *B. subtilis* sous la dépendance du promoteur *Pspac* inductible par l'IPTG. Seule la souche exprimant la fusion au niveau de l'acide aminé 306 a été utilisée. Deux préparations différentes ont permis d'obtenir des fractions membranaires et des fractions solubles (voir fiche technique N°9). Les résultats du dosage de l'activité β -lactamase sont présentés dans le tableau suivant.

fusion au niveau de l'AA N°306	activité β -lactamase (unités arbitraires)		
	surnageant	culot	total
méthode de Peters et Haldenwang	89,5 (98,4 %)	1,5 (1,6 %)	91
méthode de lyse des protoplastes	62 (97 %)	2 (3 %)	64

Ces résultats démontrent une fois de plus que cette protéine de fusion n'est pas membranaire.

IV : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le modèle topographique de la protéine SpoIIIGA proposé par Stragier et coll. (1988), les avait conduit à formuler une hypothèse sur le mécanisme qui gouvernait l'activité protéolytique de SpoIIIGA vis-à-vis de pro- σ^E . En effet, la présence d'une région assez importante exposée à l'extérieur laissait à penser qu'elle puisse être impliquée dans la perception d'un signal venant de la préspore. En réponse à ce signal, la protéine SpoIIIGA deviendrait active et pourrait ainsi provoquer la maturation de pro- σ^E spécifiquement dans la cellule mère (Figure 44, page 132).

Les expériences de fusion de gène avec la β -lactamase que j'ai réalisé montre clairement que cette protéine n'est pas membranaire mais soluble. Il est pourtant indiscutable qu'elle présente des caractéristiques hydrophobes et une répartition d'acides aminés chargés qui laissent à penser que cette protéine pourrait être affine pour la membrane, bien que non insérée dans celle-ci.

Quoiqu'il en soit, cette protéine ne possède donc pas de segment transmembranaire et encore moins de région exposée à l'extérieur. Elle ne peut donc pas jouer un rôle direct dans la perception d'un signal venant de la préspore. Ainsi il faut envisager, soit qu'il existe une autre protéine membranaire encore inconnue, impliquée dans la perception de ce signal et sa transmission vers SpoIIIGA, soit qu'il existe un autre système permettant d'activer SpoIIIGA et qui conduit ainsi à la maturation de pro- σ^E spécifiquement dans la cellule mère.

Dernièrement, Shazand et coll. (1995) ont confirmé qu'il existait plusieurs gènes dont les expressions sont contrôlées par σ^F et qui sont nécessaires à la maturation de pro- σ^E . Ces gènes sont collectivement appelés *csfX* pour gènes X contrôlés par sigma-F. Parmi ceux-ci, aucun n'a encore été clairement impliqué dans la transmission d'un signal de la préspore vers la cellule mère. A n'en pas douter, la remise en cause de la localisation membranaire de la protéine SpoIIIGA devrait conduire à la recherche de nouvelles protéines ayant des caractéristiques de protéines membranaires. Ainsi, une protéine membranaire pourrait présenter une affinité pour SpoIIIGA qui est vraisemblablement une protéine localisée à la périphérie de la membrane. On peut alors imaginer que cette protéine membranaire perçoit un signal venant de la préspore et en réponse à celui-ci, change de conformation, ce qui conduirait à une perte de l'affinité pour SpoIIIGA qui ainsi libérée, deviendrait active et pourrait donc protéolyser pro- σ^E .

Toutefois, il reste possible que l'information, délivrée via σ^F , indispensable à la maturation de pro- σ^E dans la cellule mère, ne nécessite pas de protéine membranaire.

A la suite de la communication de ces résultats au Dr P. Stragier, nous avons appris qu'il avait entrepris l'insertion d'un épitope entre les segments IV et V de SpoIIIGA. Cette protéine modifiée, exprimée chez *E. coli*, serait insérée dans la membrane. Ce résultat va à l'encontre de ceux que nous avons obtenu. C'est pourquoi, nous avons cherché à visualiser la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé 306 exprimée chez *E. coli*. Pour cela une nouvelle technique de révélation de l'activité β -lactamase directement sur gel de polyacrylamide a été mise au point. En utilisant l'indicateur coloré, le PADAC (fiche technique N°4), nous avons constaté que la taille de la protéine de fusion est beaucoup plus faible que la taille prévue. Il est donc possible que cette protéine de fusion soit la cible d'une protéase qui séparerait la partie SpoIIIGA de la partie β -lactamase. Ainsi, on comprendrait mieux pourquoi cette protéine de fusion n'est pas retrouvée dans la fraction membranaire chez *E. coli*. Mais cela n'explique pas pourquoi cette même protéine de fusion exprimée chez *B. subtilis* demeure soluble.

5 - DISCUSSION GENERALE

I - AVANTAGES DE LA TECHNIQUE DE FUSION AVEC LA β -LACTAMASE

La technique de fusion de gène avec la β -lactamase présente l'avantage de discriminer rapidement les fusions périplasmiques des fusions cytoplasmiques. De plus, les délétions avec l'exonucléase III peuvent être facilement contrôlées afin de cibler plus précisément une région. Depuis peu, on trouve dans le commerce des kits utilisant l'exonucléase III pour effectuer de courtes délétions. Enfin, s'il est nécessaire de pratiquer une fusion en un site de restriction précis, le plasmide pNF150 permet de réaliser des fusions dans les trois cadres de lecture possibles.

Les résultats obtenus pour l'analyse topographique de MdoH illustrent bien qu'il est nécessaire d'obtenir un grand nombre de fusions au niveau des régions les plus hydrophobes afin de pouvoir préciser les limites des différents segments transmembranaires. De même, afin de tester les différentes mesures prédictives d'hydrophobie et de structure secondaire, il est important de disposer d'un nombre suffisant de fusions au niveau des régions présentant un degré de prédiction moyen.

Enfin, les auteurs de cette technique (Broome-Smith et coll., 1990) ont démontré qu'elle pouvait être appliquée à des études topographiques de protéines eucaryotes exprimées chez *E. coli*. En effet, l'organisation des protéines membranaires eucaryotes dans la membrane cytoplasmique d'*E. coli* est identique à leur organisation dans leur membrane plasmique. Il faut cependant préciser que les principales modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes n'existent pas chez *E. coli*. Ainsi lorsque ces modifications influencent la topographie celle-ci ne peut pas être déterminée avec exactitude chez *E. coli*. Il faut dans ce cas utiliser des systèmes d'analyses topographiques propres aux cellules eucaryotes (Dassa, 1994).

II - INCONVENIENTS DE LA TECHNIQUE DE FUSION AVEC LA β -LACTAMASE

Bien que la technique de fusion avec la β -lactamase se soit révélée capitale pour l'analyse topographique de MdoH, on ne peut pas présenter cette approche comme étant exempte de tout problème. L'inconvénient majeur de cette technique est l'isolement de fusions résistantes à l'ampicilline alors qu'elles ne sont pas en phase, comme l'illustre la fusion au niveau de l'acide aminé 825 de MdoH. En amont du point de ce fusion, se situe un codon ATG en phase avec la β -lactamase. Ce codon est précédé d'une séquence de Shine et Dalgarno assez proche de la séquence

consensus ce qui permet à cette fusion de s'exprimer. Certes, cette fusion se révèle moins résistante à l'ampicilline que d'autres ayant un phénotype cytoplasmique, mais elle reste toujours plus résistante que des cellules qui n'expriment pas du tout de β -lactamase ou qui expriment des fusions qui ne sont pas en phase. Afin de remédier à cet inconvénient, il est possible d'augmenter la concentration d'ampicilline lors du repiquage des clones, à condition que le niveau d'expression des protéines hybrides soit suffisamment élevé. Dans le cas de l'étude sur MdoH, j'ai utilisé une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, alors que les auteurs préconisent une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$. C'est sans doute la raison pour laquelle j'ai obtenu quelques fusions qui n'étaient pas en phase. Ainsi j'ai séquencé un total de 67 points de fusion parmi lesquels seuls 6 n'étaient pas en phase et 10 étaient des fusions déjà obtenues.

Le deuxième problème est qu'il a été plus difficile de cibler les régions hydrophobes par rapport aux régions hydrophiles, aussi bien dans le cas de l'étude de MdoH que dans le celui de SpoIIGA. Le fait qu'il soit possible que des fusions au niveau des segments provoquent des désorganisations membranaires à l'origine de l'instabilité des fusions, ou même de la létalité de certaines cellules, n'empêche pas une analyse topographique précise puisque pour MdoH j'ai obtenu un certain nombre de fusions localisées dans les segments transmembranaires. De plus, ces fusions « toxiques » ne concernent que des positions très précises autour desquelles il est toujours possible d'obtenir des fusions « non toxiques ».

L'étude de la protéine SpoIIGA nous permet de rappeler un problème général à l'ensemble des techniques de fusions de gènes. Il s'agit de la formation de protéines hybrides dont on ne peut prévoir la stabilité. Il apparaît clairement que dans le cas de l'étude de SpoIIGA le nombre de protéines de fusion obtenues est très insuffisant par rapport aux moyens mis en oeuvre. Ceci ne peut pas s'expliquer par des problèmes d'expression et de stabilité de SpoIIGA chez *E. coli*. En effet, cette protéine a déjà fait l'objet d'études menée chez *E. coli*. D'autre part, la β -lactamase démunie de sa séquence signal s'exprime d'une manière parfaitement active chez *E. coli*. Ainsi, seules les protéines de fusion semblent à l'origine des problèmes rencontrés. Aujourd'hui encore la nature de ces problèmes demeure imprécise, bien que l'on ait mis en évidence que la protéine de fusion au niveau de l'acide aminé 306 de SpoIIGA ne présentait pas la taille attendue en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, mais une taille beaucoup plus faible. Ceci pourrait donc signifier qu'il existe une protéase qui dégrade la protéine hybride.

III - FUTURE UTILISATION DE LA β -LACTAMASE

En 1992 Francisco et coll. ont rapporté qu'il est possible de localiser la β -lactamase à la surface d'*E. coli*. Pour cela ils ont créé une protéine de fusion entre les 9 premiers résidus de la lipoprotéine majeure avec différents fragments de la porine OmpA à la suite de laquelle est fusionnée la β -lactamase. Cette protéine hybride est dirigée vers la membrane externe où elle s'insère grâce aux segments de la porine OmpA, segments qui permettent alors le passage de la partie β -lactamase à l'extérieur de la cellule. Au-delà du fait remarquable qu'une protéine périplasmique puisse être localisée à l'extérieur de la cellule, on peut retenir de cette expérience qu'il semble possible d'utiliser la β -lactamase comme reporter pour effectuer une analyse topographique des protéines de la membrane externe. Dans ce cas, la sélection de toutes les protéines de fusions en phase peut s'effectuer directement sur un milieu contenant de l'ampicilline. Puis la discrimination entre les deux types de localisation possibles pourra s'effectuer par l'utilisation d'un indicateur coloré comme le PADAC. En effet, celui ne peut pas franchir la membrane externe et il ne sera donc dégradé que par les cellules exprimant des protéines de fusions localisant la partie β -lactamase à l'extérieur. On peut aussi utiliser un anti-sérum anti- β -lactamase qui reconnaîtront uniquement les cellules exprimant une β -lactamase localisée à l'extérieur de la cellule.

IV - L'ETABLISSEMENT DE LA TOPOGRAPHIE D'UNE PROTEINE MEMBRANAIRE NECESSITE L'EMPLOI DE PLUSIEURS TECHNIQUES

La mise en évidence de fusions ayant un phénotype périplasmique alors que la position du point de fusion est cytoplasmique, nous conduit à renforcer l'idée selon laquelle il est nécessaire de faire appel à plusieurs techniques pour définir un modèle topographique. Parmi ces autres techniques, il est important de faire appel à des profils d'hydrophobie, à des méthodes de prédiction de structures secondaires ainsi qu'à la règle de von Heijne (1982) sur la répartition des acides aminés chargés, et aussi à une technique « *in vivo* » comme l'accessibilité aux protéases. Si l'on conçoit assez bien que ses techniques prises les unes indépendamment des autres ne peuvent pas permettre une analyse topographique fine, notamment à cause du « pourcentage de fiabilité » des méthodes prédictives, on s'aperçoit que la mise en commun de leurs résultats conduit à l'établissement d'un modèle topographique « juste ». Cependant, il n'est pas rare d'observer des contradictions entre les résultats de ces différentes approches. En effet, les profils d'hydrophobie et les prédictions de structure secondaires sont rapidement limités dans leur résolution. Quant à la règle de von Heijne il a été rapporté un exemple où deux protéines très similaires, TolR et ExbD, présentent une topographie

identique bien que la répartition des charges à la limite de leur premier segment transmembranaire soit opposée (Hennessey et Broome-Smith, 1994). Pour TolR la répartition des charges suit la règle de von Heijne, alors que pour ExbD la répartition est totalement en contradiction avec cette règle puisque la région cytoplasmique en question présente 5 résidus acides et aucun résidu basique. Dans ce cas, ce sont les résultats des données expérimentales obtenues à partir de protéines de fusion qui ont été privilégiés aux résultats de la règle de von Heijne.

En conclusion, une approche multidisciplinaire est la seule approche qui permette de pouvoir établir la topographie d'une protéine membranaire complexe.

FICHES TECHNIQUES

FICHE TECHNIQUE N° 1

SOUCHES ET MILIEUX

1°) LES SOUCHES

Les souches d'*E. coli* K12 utilisées sont décrites dans le tableau VII, page 151.

2°) MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C ou à 30°C avec une forte agitation en milieu Luria Broth (LB ; Miller, 1992), ou dans un milieu de basse osmolarité (LOS), ou dans un milieu minimum (63) supplémenté par les métabolites nécessaires et du glucose (2 g/l) comme source de carbone (Miller, 1992), ou encore dans un milieu DMAM lors du marquage des protéines (voir fiche technique N°8).

Le milieu de basse osmolarité (LOS) contient : K_2HPO_4 (1 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (1,5 mM), $MgCl_2$ (0,08 mM), $FeSO_4$ (0,5 mg/l), thiamine (2 mg/l) et un hydrolysate de caséine (4 g/l ; casamino acids, vitamin-free, Difco). Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris (1 M). L'osmolarité de ce milieu a été estimée à 70 mosM. Elle peut être augmentée par l'addition de NaCl (4 M).

La croissance des bactéries est suivie par la mesure de la turbidité du milieu à 620 nm. Une densité optique de 1 correspond à une concentration de bactéries de 10^9 cellules/ml.

Les antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : ampicilline, 50 µg/ml ; kanamycine, 50 µg/ml ; spectinomycine, 50 µg/ml ; tétracycline, 25 µg/ml.

Le X-Gal (5-bromo 4-chloro 3-indolyl β-D-galactopyranoside) est utilisé dans les milieux à la concentration de 40 µg/ml ; l'IPTG (isopropylthio-β-D-galactopyranoside) à 25 µg/ml.

Tous ces milieux sont solidifiés par de l'agar à 15 g/l.

TABEAU VII :LISTE DES GENOTYPES DES SOUCHES UTILISEES D'*E. coli* K12

SOUCHE	GENOTYPE	ORIGINE
K38	HfrC	Russel et Model, 1984
PAP1568	pGP-1 dans K38	
JM83	$\Delta(lac-pro)$, <i>thi</i> , <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , ($\Phi 80 lacZ\Delta M15$)	Vieira et Messing, 1982
DF214	<i>his</i> , <i>pgi::Mu</i> , $\Delta(zwf-edd)1$ <i>eda-1</i> , <i>rpsL</i>	Vinopal et coll., 1975
CA10	HfrH, <i>galU95</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , λ^-	souche du laboratoire
NFB1807	CA10, $\Delta mdoGH203::neo$	cette étude
NFB1808	CA10, <i>mdoH200::Tn10</i>	cette étude
NFB1809	CA10, <i>mdoG202::neo</i>	cette étude
NFB216	JM83, <i>pyrC46</i> , <i>mdoH200::Tn10</i>	Lacroix et coll., 1989
NFB220	JM83, <i>mdoA1</i>	Lacroix, 1989
NFB702	JM83, <i>pyrC46</i> , <i>mdoG202::neo</i>	Loubens, 1993
NFB724	DF214, <i>mdoG202::neo</i>	Lacroix et coll., 1991

FICHE TECHNIQUE N°2

PRINCIPAUX PLASMIDES UTILISÉS

VECTEUR	CARACTERISTIQUE	ORIGINE
pGP-1	Kan ^R	Tabor et Richardson, 1985
pT7-6	Amp ^R	Tabor et Richardson, 1985
pUC8	Amp ^R	Vieira et Messing, 1982
pYZ4	Kan ^R	Broome-Smith et coll., 1990
pYZ5	Tet ^R	Broome-Smith et coll., 1990
pNF201	Amp ^R	Lacroix et coll. 1989
pNF206	Amp ^R	Lacroix et coll. 1989
pNF239	Amp ^R	Lacroix et coll. 1989
pNF243	Amp ^R	Lacroix et coll. 1989
pNF244	Amp ^R	Lacroix et coll. 1989
pNF252	Kan ^R	Lacroix et coll. 1991

FICHE TECHNIQUE N°3

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1°) TRANSFORMATION

Les cellules d'*E. coli* ont été rendues compétentes et transformées selon la méthode au chlorure de rubidium de D. Hanahan (1983).

2°) PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE

L'ADN plasmidique est préparé en grande quantité par la méthode de lysat clair de Clewell et Helinski (1979).

La préparation rapide de l'ADN plasmidique est réalisée par « ébullition » selon la méthode de Holmes et Quigley (1981).

3°) ENZYMES DE RESTRICTION ET DE MODIFICATION

Toutes les endonucléases de restriction ont été employées dans les conditions recommandées par les fournisseurs (Eurogentec, Boehringer, Gibco BRL et Pharmacia).

Le fragment Klenow de l'ADN-polymérase I d'*E. coli* a été employé dans le tampon fourni par Gibco BRL, lorsque l'on privilégie son activité exonucléase 3'→5', et dans le même tampon complété par les 4 dNTP à une concentration finale de 2 mM lorsque l'on privilégie son activité polymérase 5'→3'. Dans les deux cas l'incubation s'effectue à température ambiante pendant 20 min.

L'ADN-ligase du bactériophage T4 a été employée dans le tampon fourni par Gibco BRL, à une concentration de 1 unité pour 1µg d'ADN à ligaturer, pendant une durée de 2h à température ambiante.

4°) ELECTROPHORESE ET PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN

Les fragments de restriction sont analysés par leur migration sur un gel d'agarose à 1% dans un tampon TBE (Tris 89 mM, acide borique 89 mM et EDTA 5 mM), en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et, s'il s'agit d'une préparation rapide, de ribonucléase A (2,5 µg/ml).

Les fragments que l'on désire purifier à partir d'un gel d'agarose sont séparés par une migration sur un gel à 0,8 % dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 40 mM et EDTA 1 mM). La purification est réalisée par la technique au phénol froid décrite par Silhavy et coll. (1984).

5°) SEQUENÇAGE NUCLEOTIDIQUE

Pour le séquençage nucléotidique, nous employons le kit Sequenase version 2 de USB Corporation. L'ADN simple brin est obtenu par la dénaturation à la soude 2N pendant 20 min à 37°C. La séparation des produits de séquençage s'effectue par une électrophorèse (45 mA) d'un gel de polyacrylamide 19/1 à 6%, en présence d'urée à 42%, sur une longueur de 38 cm.

FICHE TECHNIQUE N° 4

FUSIONS DE GENE AVEC LA β -LACTAMASE

1°) CONSTRUCTION DES DELETIONS A L'AIDE DE L'EXONUCLEASE III

Le protocole décrit ci-après a été adapté de celui décrit par S. Henikoff (1984).

12 μ g des plasmides pNF318 ou pNF401 ou pNF426 ont été digérés par les endonucléases *Hind*III et *Sac*I. L'ADN a été ensuite purifié par un traitement au chloroforme/alcool isoamylique, puis précipité par l'éthanol. Le culot est repris par 34 μ l de tampon exonucléase III, auquel on ajoute 1 μ l d'exonucléase III, soit 100 unités. La digestion s'effectue à 30°C, et des aliquots de 5 μ l sont prélevés à différents temps, de 30 s à 20 min. A ces échantillons on ajoute 20 μ l d'eau, et on les place à 70°C pendant 10 min. Puis, on ajoute dans chaque tube, 5 μ l d'un mélange réactionnel contenant le tampon de la nucléase SI, et 40 unités de nucléase SI. Les tubes sont placés à 37°C pendant 20 min, et la totalité des échantillons est déposée sur un gel d'agarose à 0,8%. Après une migration électrophorétique, on découpe les bandes correspondantes à des délétions, et on les purifie par la méthode au phénol froid (Silhavy et coll, 1984). Les fragments d'ADN sont alors traités par le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I d'*E. coli*. Pendant 15 min on privilégie son activité exonucléase 3'→5', et ensuite on ajoute un mélange des 4 dNTP pour favoriser son activité polymérase 5'→3' pendant 15 min (voir fiche technique N°3). Après ceci, on purifie l'ADN par une étape de chloroforme/alcool isoamylique. Enfin, l'ADN est ligaturé et introduit dans la souche NFB216. Les transformants sont sélectionnés sur des boîtes de Petri contenant de la kanamycine.

La composition des tampons est la suivante :

Tampon exonucléase III x 10 : Tris-HCl 660 mM pH 8, MgCl₂ 66 mM.

Tampon nucléase SI x 10 : NaCl 2 M, ZnSO₄ 10 mM, acétate de sodium 0,5 M pH 4,5, glycérol 5%.

2°) ANALYSE DES CLONES RECOMBINANTS

Chaque clone est repiqué sur une boîte de Petri contenant de l'ampicilline à 50 μ g/ml. Tous les clones résistants de cette manière à l'ampicilline, sont striés de façon à obtenir des colonies isolées sur des boîtes contenant de l'ampicilline. Tous les clones capables de former des colonies isolées ont été analysés par restriction afin de déterminer la taille de la délétion. Il en a été de même pour une grande partie des clones incapables de former des colonies isolées. Tous les clones présentant des

profils de restriction différents ont été séquencés avec une amorce complémentaire de la partie 5' de *blaM* (5'-CCCACTCGTGCACCCAACCT-3', synthétisée par Eurogentec).

3°) DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES D'AMPICILLINE

Environ 200 à 300 bactéries ont été étalées sur des boîtes de Petri contenant différentes concentrations d'ampicilline : 4, 6, 8, 10, 20, 40, 80, 100, 200 µg/ml. Comme témoin, une même quantité de bactéries a été étalée sur une boîte de Petri contenant de la kanamycine. La valeur de la concentration minimale inhibitrice correspond à la concentration d'ampicilline suffisante pour qu'aucune colonie ne se forme.

4°) DOSAGES DE L'ACTIVITE β -LACTAMASE

Des souches exprimant des protéines de fusion sont cultivées en LB (50 ml) avec de la kanamycine, jusqu'à une DO à 620 nm égale à 0,5. Les cultures sont alors centrifugées à 4000g à 4°C pendant 10 min, lavées une fois par un même volume, puis centrifugées à nouveau et concentrées 10 fois avant d'être cassées par un passage dans une cellule de la presse de French (1,25.10⁸ Pa). Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 8000g pendant 10 min, puis le surnageant est centrifugé à 100000g à 4°C pendant 1h. Le surnageant résultant est appelé fraction soluble, et le culot fraction insoluble, cette dernière étant reprise dans un volume deux fois inférieur au volume de la fraction soluble. L'activité β -lactamase des ces deux fractions a été dosée par 2 techniques différentes.

La première technique décrite par R. P. Novick (1962), utilise une méthode iodométrique indirecte. Le tampon utilisé lors de la préparation des cellules est alors celui décrit par J. H. Miller (1992), auquel on ajoute du PMSF à une concentration finale de 1 mM.

La deuxième est une méthode directe qui utilise un chromogène appelé le PADAC (Schindler et Huber, 1980), et a été utilisé selon le protocole décrit par Weiner et coll. (1990). Le tampon utilisée est alors du MOPS 50 mM pH 7,5, auquel on ajoute du PMSF à une concentration finale de 1 mM.

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin (Lowry et coll., 1951). Une solution d'albumine du sérum de boeuf a été utilisée pour effectuer les gammes étalon. Les résultats sont similaires quelque soit les souches : 0,6 mg/ml de protéines dans les culots et 1,2 mg/ml de protéines dans les surnageants.

FICHE TECHNIQUE N°5

MARQUAGE ET EXTRACTION DU MDO

1°) MARQUAGE AU [2-³H] GLYCEROL

Le dosage est réalisé sur des bactéries cultivées une nuit à 30°C dans un milieu de basse osmolarité LOS, additionné de [2-³H] glycérol (0,45 mM; 296 MBq/mmol), et éventuellement d'antibiotique. Pour l'analyse rapide du phénotype MDO des clones recombinants, des cultures de 1 ml ont étéensemencées directement à partir de colonies isolées prélevées sur des boîtes de milieu sélectif. Lorsque l'on désire analyser plus précisément le contenu en MDO, on effectue le dosage sur des cultures de 5 mlensemencées à partir de précultures en milieu LOS.

La méthode d'extraction utilisée fait intervenir l'acide trichloroacétique (ATCA) à 30% dans lequel le MDO reste soluble tandis que les macromolécules sont précipitées. A 1 volume de culture on ajoute 0,2 volume de ATCA 30% et 0,2 volume de sérum d'albumine bovin (SAB) à 5% (Sigma) servant d'entraîneur. Après centrifugation on ajoute au surnageant 0,4 volume d'une suspension de charbon de bois végétal (50 mg/ml) sur lequel le MDO s'adsorbe. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée destinés à éliminer la radioactivité non spécifique, on extrait 2 fois, par 0,2 volume de pyridine 15%, les molécules adsorbées sur le charbon. Cet extrait pyridine contient 80 à 90% de MDO et 10 à 20% d'impuretés. Le comptage de la radioactivité est effectué par scintillation liquide.

A partir d'une extraction effectuée sur 5 ml de culture, une fraction de l'extrait pyridine (1,5 ml) peut être analysée par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-25. La colonne a une section de 2 cm², et 45 cm de hauteur. Elle est préparée avec de l'acétate d'ammonium 0,15M dans une solution de propanol 7% (volume/volume) dans de l'eau. La colonne est éluée avec le même tampon, à la vitesse de 17 ml/h. Des fractions de 1,5 ml sont collectées et leur radioactivité est déterminée.

2°) MARQUAGE AU D-[U¹⁴C] GLUCOSE

Le marquage du MDO au D-[U¹⁴C] glucose ne peut être obtenu que dans la souche DF214, souche incapable de synthétiser et de dégrader le glucose (voir Figure 3, page 22), ou l'une de ses dérivées. Ce marquage est réalisé dans un milieu LOS additionné de D-[U¹⁴C] glucose (0,24 mM; 9,3 GBq/mmol). Un volume de culture de 5 ml est nécessaire pour effectuer un suivi de la croissance, et

pour une bonne reproductibilité, les cultures sont arrêtées lorsque la DO à 620 nm est égale à 0,5. En ce qui concerne l'extraction du MDO, on emploie la méthode décrite précédemment.

FICHE TECHNIQUE N°6

DOSAGE « *IN VIVO* » DE L'ACTIVITE DE MDOH

1°) PERMEABILISATION DES CELLULES

a) Préparation des cellules

La souche CA10 est cultivée en milieu LOS jusqu'à ce que la DO à 620 nm soit égale à 0,5. Les cellules sont alors centrifugées à 4°C pendant 10 min à 4000g, et reprises dans 1/10 du volume de culture par un tampon MOPS 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 6 mM. Puis elles sont à nouveau centrifugées comme précédemment et resuspendues dans 1/100 du volume de culture par le même tampon. Pour effectuer une seule réaction, 80 µl de cellules sont suffisants.

b) Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est préparé à 4°C dans le même tampon que celui utilisé pour préparer les cellules, additionné d'UDP-[1-³H] glucose (241GBq/mmmole). La concentration finale en UDP-glucose lors de la réaction est de 2,5 mM. Pour effectuer une seule réaction, 120µl du mélange réactionnel sont suffisants.

c) Perméabilisation

La préparation cellulaire est ajoutée au mélange réactionnel, et le tout est plongé 2 min dans un mélange carboglace/éthanol. Puis le tube est placé à 37°C pendant 10 min, avant d'être centrifugé pendant 5 min à 8000g. Le surnageant est éliminé, et les cellules sont reprises dans le milieu LOS (la totalité des cellules utilisées pour une seule réaction est reprise par 10 ml de milieu). Puis, cette suspension cellulaire est cultivée à 37°C pendant au moins 2h. Les cultures sont arrêtées par l'ajout de ATCA et de SAB afin de pouvoir extraire leur contenu en MDO (voir fiche technique N°5).

2°) ANALYSE DES PRODUITS FORMES

Le volume des extraits pyridine est réduit par un évaporateur rotatif jusqu'à 500 µl. Ces extraits sont chromatographiés sur une colonne de Biogel P4 (diamètre 0,8 cm, hauteur 55 cm). L'élution s'effectue par un tampon eau/acide acétique 0,5%, à un débit de 4 ml/h. Des fractions de 500 µl sont collectées et leur contenu radioactif est mesuré par scintillation liquide.

FICHE TECHNIQUE N°7

MUTAGENESE DIRIGEE

1°) PRINCIPE DE LA METHODE DE KUNKEL

Le plasmide portant le fragment cible de la mutagenèse est introduit dans la souche double mutante *dut*, *ung*, CJ236. La mutation *dut* a pour conséquence une déficience de la dUTPase, ce qui provoque une concentration élevée de dUTP qui entre en compétition avec le dTTP. La mutation *ung* provoque une déficience en uracil N-glycosylase qui est chargée d'éliminer les uraciles introduits par erreur dans l'ADN. Cette double mutation contraint donc la cellule à synthétiser l'ADN avec la base uracile à la place de la thymine. Plusieurs cycles de culture (au moins 3) sont nécessaires pour que la totalité des bases thymine du plasmide soit remplacée par des bases uracile. Grâce à un phage auxiliaire, il est possible de préparer de l'ADN simple brin (si le plasmide possède une origine de répllication F1), qui sera entièrement constitué d'uracile. Cet ADN simple brin est alors hybridé avec l'oligonucléotide portant la mutation, et on synthétise *in vitro* le brin complémentaire avec les 4 bases classiques. Lorsque l'on transformera une souche d'*E. coli* sauvage pour les locus *dut* et *ung*, par ce plasmide « hybride », il sera synthétisé de nouvelles copies de ce plasmide ne contenant que des thymines. Ainsi, cette méthode permet d'exercer une forte sélection biologique du brin portant la mutation par rapport au brin d'ADN matrice (Kunkel, 1985, Kunkel et coll., 1987).

2°) LA MUTAGENESE EFFECTUEE SUR *mdoH*

a) But de la mutagenèse dirigée

Nous avons choisi de changer le résidu arginine en position 318 par un résidu alanine grâce l'utilisation de l'oligonucléotide suivant (synthétisé par Eurogentec) :

brin matrice :

5'...TAT CGC CGC CGC CGT CGC CGC GTG AAG GCT AAA AGC...3'
3'-GCG GCG GCG **CGA** GCG GCG CAC TTC CG-5'

amorce :

b) Préparation du brin matrice

Le plasmide pNF309 a été introduit dans la souche CJ236. La souche résultante a été cultivée pendant 3 jours, avec un changement de milieu 2 fois par jour. A 20 ml de culture à DO égale à 0,15 ont été ajoutés 200 µl de phage auxiliaire R408 (3.10^{11} ufp/ml ; ufp : unité formatrice de plage ;

Russel et coll., 1986) Cette culture a été poursuivie pendant 4h30 à 37°C. Les cellules ont alors été centrifugées pendant 5 min à 8000g et le surnageant a été à nouveau centrifugé 10 min à 8000g, afin de supprimer toutes traces de cellules dans le surnageant. Un volume de 16 ml de surnageant a alors été aliquoté par 1 ml dans des tubes de type Eppendorf, et dans chacun de ces tubes on ajoute 300 µl de PEG6000 20%/NaCl 2,5M. Après 15 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 8000g. Le surnageant est jeté et les culots sont repris par 100 µl d'eau. Puis on purifie l'ADN simple brin en 4 étapes : 2 étapes de phénol/chloroforme (1/1) et 2 étapes de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Enfin l'ADN est précipité, les culots sont regroupés, et la quantité est estimée par la migration d'un échantillon sur un gel d'agarose. Ainsi j'ai pu obtenir une préparation d'ADN simple brin de pNF309 à une concentration de 0,2 µg/µl.

c) Phosphorylation de l'oligonucléotide

L'oligonucléotide a été repris dans un volume d'eau de façon à obtenir une concentration de 1 µg/µl, soit 108 pmoles/µl. 1 µg d'oligonucléotide a été phosphorylé par 20 unités de la polynucléotide kinase du bactériophage T4 dans un volume de 50 µl, pendant 1h à 37°C puis 10 min à 65°C. Le tampon utilisé est le suivant : Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP (pH 5,5) 10 mM.

d) Hybridation et synthèse du brin complémentaire

L'hybridation a été réalisée entre 20 µl d'oligonucléotide phosphorylé et 6 µl d'ADN simple brin, soit un rapport de 40 pmoles d'oligonucléotide pour 0,5 pmole de brin matrice, dans un volume final de 50 µl. Ce mélange est chauffé à 70°C pendant 1 min. La température est ensuite ramenée à 20°C très progressivement (1 à 2°C/min). Le tampon utilisé est le suivant : Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 4 mM, NaCl 50 mM.

Au tube précédent, on ajoute 2,5 unités de l'ADN-polymérase du bactériophage T4 et 2 unités de l'ADN-ligase du bactériophage T4. La réaction est réalisée dans un volume de 70 µl, et débute par une incubation de 5 min à 0°C, puis 5 min à la température ambiante, et enfin 2h à 37°C. Pour arrêter cette réaction on ajoute 3 µl d'EDTA à 500 mM. La composition du tampon est la suivante : Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 2,5 mM, chaque dNTP 0,7 mM, ATP 2 mM.

e) Transformation et recherche des mutants

La souche NFB220 a été transformée par 5, 10, 15 et 20 µl du tube précédent. Les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes de Petri contenant de la kanamycine. Le nombre des clones obtenus a été respectivement de 46, 115, 208 et 307. Le contenu en MDO de plusieurs clones a été déterminé par la méthode décrite dans la fiche technique N°5.

FICHE TECHNIQUE N°8

MARQUAGE DES PROTEINES AU ³⁵S

1°) PRINCIPE

La technique de marquage des protéines au ³⁵S décrites ci-dessous a été mise au point par Tabor et Richardson (1985). Cette technique est basée sur le fait que l'ARN-polymérase du phage T7 est spécifique de son propre promoteur et qu'elle est insensible à la rifampicine. Cette technique nécessite la transformation de la souche d'*E. coli* K38 par deux plasmides compatibles. D'une part le plasmide pT7-6 possédant le promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7, promoteur sous lequel sera placé le gène dont on veut radiomarquer le produit. D'autre part le plasmide pGP1-2 possédant le gène de l'ARN-polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur inductible λP_L , et le gène cI857 répresseur de λ sensible à la température. Ainsi transformée par ces deux plasmides la souche est placée dans un milieu dépourvu de méthionine. Puis, on bloque la synthèse des ARN par l'ajout de rifampicine, et on effectue un choc thermique permettant l'expression du gène de l'ARN-polymérase du phage T7. Cette ARN-polymérase peut alors transcrire spécifiquement le gène placé sous le contrôle de son promoteur. Enfin, la souche est replacée dans un milieu contenant de la méthionine radiomarquée qui est rapidement utilisée pour synthétiser la protéine codée par le gène placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7.

2°) LA PREPARATION DES CELLULES

La souche PAPI568 est transformée par les différents plasmides dérivés de pT7-6. Les transformants sont sélectionnés sur une boîte de Petri contenant de l'ampicilline et de la kanamycine à une température de 30°C.

Pour réaliser le marquage des protéines, on cultive les différentes souches dans le milieu LB en présence des antibiotiques requis. Quand la DO à 620nm est égale à 0,3, 1ml de culture est centrifugé pendant 3 min à 4000g puis le culot est resuspendu dans 1ml de milieu 63. Ce volume est à nouveau centrifugé comme précédemment et le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu 63DMAM (10 mg/ml) complété par les antibiotiques. Les cellules sont à nouveau mises en culture à 30°C pendant 1 heure.

(le milieu 63 DMAM (10 mg/ml) est obtenu par le mélange d'un volume de milieu 63 x 2 et d'un volume de milieu DMAM x 2 (20 mg/ml), ce dernier est préparé selon les recommandations du fournisseur, Difco)

Puis les cellules sont placées à 42°C pendant 30 min après que l'on ait ajouté de la rifampicine de façon à obtenir une concentration finale de 200 µg/ml. Enfin les cellules sont replacées à 30°C pendant 20 min.

3°) LE MARQUAGE ET LA REVELATION DES PROTEINES

500 µl de la culture sont placés dans un tube de type Eppendorf contenant 0,37 MBq de Trans Label (mélange de méthionine et de cystéine ³⁵S, ICN). Les tubes sont placés 5 min à 30°C puis centrifugés pendant 2 min à 8000g. Le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau plus 30 µl de tampon de dépôt (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, SDS 2% (vol/vol), β-mercaptoéthanol (10% vol/vol), glycérol 20% (vol/vol), bleu de bromophénol 50 µg/ml).

15 µl de la préparation précédente sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% en SDS (3,5 mM). La migration des échantillons s'effectue pendant 2h30 à 50 mA dans un tampon (Tris 25 mM, glycine 190 mM, SDS 3,5 mM).

Après la révélation des témoins de masses moléculaires au bleu de Coomassie, le gel est séché puis autoradiographié pendant une nuit.

FICHE TECHNIQUE N°9

DOSAGE DE L'ACTIVITÉ β -LACTAMASE

CHEZ *BACILLUS SUBTILIS*

Un volume de 800 ml de la souche, exprimant la fusion avec SpoIIIGA-BlaM à la position 306 a été cultivée en présence d'IPTG (1 mM) à 37°C. La composition du milieu de culture est la suivante : Nutrient Broth (Difco) 8 g/l, KCl 1 g/l, MgSO₄ 0,25 g/l MnCl₂ 10 μ M, FeSO₄ 1 μ M, (NO₃)₂Ca 500 μ M. Au stade III de la sporulation, les cellules sont centrifugées à 4000g pendant 20 min, et reprises par 80 ml dans le tampon phosphate 100 mM, pH 7.

→ 40 ml de cellules sont alors utilisés pour effectuer une préparation similaire à celle décrite par Peters et Haldenwang (1991). A la suspension cellulaire est ajoutée du lysozyme (pour obtenir une concentration finale de 20 mg/ml) et du MgSO₄ (pour obtenir une concentration finale de 20 mM). La lyse des cellules s'effectuent à 37°C. Puis on ajoute de la DNase et de la RNase (pour obtenir une concentration de 25 μ g/ml). Après 30 min, on centrifuge à 2000g pendant 20 min. Enfin, une fraction du surnageant est prélevé (comme témoin de l'activité totale) et le reste est à nouveau centrifugé à 30000g pendant 30 min. Les activités β -lactamase du surnageant, du culot (repris dans le 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 7), et de la fraction témoin de l'activité totale, sont déterminées par la technique utilisant le PADAC (voir fiche technique N°4).

→ 40 ml de cellules sont à nouveau centrifugés à 4000g pendant 20 min, et resuspendues dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8 à 0°C. Une nouvelle centrifugation est réalisée et les cellules sont alors reprises par 40 ml de tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, 20% saccharose à température ambiante. On ajoute alors en présence d'une agitation magnétique, de l'EDTA, pH8 (pour obtenir une concentration finale de 10 mM) et du lysozyme (pour obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml). Après 30 min à température ambiante, la préparation de protoplastes est centrifugée à 16000g pendant 30 min. Le culot est alors repris par 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,6, 20% saccharose, 20 mM MgSO₄. On ajoute alors de la DNase et de la RNase (pour obtenir une concentration finale de 10 μ g/ml). On homogénéise avec un Potter. Puis après 15 min, les protoplastes sont lysés en les plaçant dans 200 ml de tampon phosphate 50 mM pH 6,6 à 37°C, avec une forte agitation magnétique, pendant 15 min. Puis on ajoute de l'EDTA (pour obtenir une concentration finale de 10 mM), et 15 min plus tard du MgSO₄ (pour obtenir une concentration

finale de 15 mM). Le lysât est centrifugé à 30000g pendant 30 min. Le culot de membranes est alors repris par 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 7. Les activités β -lactamase du culot et du surnageant sont dosées comme précédemment.

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin (Lowry et coll., 1951). Une solution d'albumine du sérum de boeuf a été utilisée pour effectuer la gamme étalon.

7 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahl P.L., L.J. Stern, D. During, T. Mogi, H.G. Khorana, K.J. Rothschild (1988). Effects of amino acid substitution in the F helix of bacteriorhodopsin. low temperature ultraviolet / visible difference spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **263** : 13594-13601
- Bardwell J.C.A. (1994). Building bridges: disulfide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14** : 199-205
- Bayan N. (1990). Rôle de l'« Acyl Carrier Protein » dans la biosynthèse des oligosaccharides osmorégulés (M. D. O.) chez *E. coli*. Thèse de Docteur en Sciences. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay
- Bayan N., H. Thérissod (1989a). Evidence for interactions of acyl carrier protein with glycerol-3-phosphate acyltransferase, an inner membrane protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **255** : 330-334
- Bayan N., H. Therisod (1989b). Membrane-binding sites for acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **253** : 221-225
- Betton J.-M., P. Martineau, W. Saurin, M. Hofnung (1993). Location of tolerated insertions/deletions in the structure of the maltose binding protein. *FEBS Lett.* **325** : 34-38
- Blight M.A., B. Holland (1990). Structure et fonction of haemolysine B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* **4** : 873-880
- Bockaert J. (1995). Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *Médecine / Sciences* **11** : 382-394
- Bohin J.-P., 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
- Bouveret E., R. Derouiche, A. Rigal, R. Llobes, C. Lazdunski, H. Benedetti (1995). Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. *J. Biol. Chem.* **270** : 11071-11077
- Boyd D., C. Manoil., J. Beckwith (1987). Determinants of membrane protein topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84** : 8525-8529
- Boyd D., J. Beckwith (1989). Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 9446-9450
- Breedveld M.W., K.J. Miller (1994). Cyclic β -glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58** : 145-161
- Breedveld M.W., L.P.T.M. Zevenhuizen, A.J.B. Zehnder (1991). Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic β -(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1. *Arch. Microbiol.* **156** : 501-506

- Broome-Smith J.K., B.G. Spratt (1986). A vector for the construction of translational fusions to TEM β -lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene* **49** : 341-349
- Broome-Smith J.K., M. Tadayyon, Y. Zhang (1990). β -lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* **4** : 1637-1644
- Brundage L., J.P. Hendrick, E. Schiebel, A.J.M. Driessen, W. Wickner (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62** : 649-657
- Büchel D.E., B. Gronenborn, B. Müller-Hill (1980). Sequence of the lactose permease gene. *Nature* **283** : 541-545
- Buhr A., B. Erni (1993). Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268** : 11599-11603
- Burbulys D., K.A. Trach, J.A. Hoch (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64** : 545-552
- Busby S., R.H. Ebright (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79** : 743-746
- Calamia J., C. Manoil (1990). Lac permease of *Escherichia coli* : topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** : 4937-4941
- Calamia J., C. Manoil (1992). Membrane protein spanning segments as export signals. *J. Mol. Biol.* **224** : 539-543
- Cangelosi G.A., G. Martinetti, J.A. Leigh, C.C. Lee, C. Theines, E.W. Nester (1989). Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **171** : 1609-1615
- Cao G., A. Kuhn, R.E. Dalbey (1995). The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential : evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *EMBO J.* **14** : 866-875
- Casabadan M.J., S.N. Cohen (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76** : 4530-4533
- Chou , G.D. Fasman (1978) .Prediction of protein secondary structure from amino acid sequence. *Advances in Enzymology.* **47** : 45-148
- Clewell D B.,D.R. Helinski (1979). Supercoiled circular DNA protein complex in *Escherichia coli* : purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **62** : 1444-1448

- Cohen J.L., K.J. Miller (1991). A novel membrane-bound glucosyltransferase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **173** : 4271-4276
- Cowan S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius, J.P. Rosenbusch (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358** : 727-733
- Cutting S., Roels S, R. Losick (1991). Sporulation operon *spoIVF* and the characterization of mutations that uncouple mother-cell from forespore gene expression in *B. subtilis*. *J. Mol. Biol.* **221** : 1237-1256
- Dassa E., S. Muir (1993) .Membrane topology of MalG, an inner membrane protein from the maltose transport system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7** : 29-38
- Dassa E. (1994). Structure et mise en place des protéines intégrales de membrane. Cahier IMABIO du CNRS. N° 11. 5-11
- Davidson A.L., H. Nikaido (1991). Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266** : 8946-8951
- Degli Esposti M., M. Crimi, G. Venturoli (1990). A critical evaluation of the hydropathy profile of membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **190** : 207-219
- Deisenhofer J., H. Michel (1989). The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J.* **8** : 2149-2170
- Deisenhofer J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* **318** : 618-624
- Dell A., W. S. York, M. Mc Neil, A. G. Darvill, P. Albersheim (1983). The cyclic structure of β-D-(1,2)-linked D-glucans secreted by Rhizobia and Agrobacteria. *Carbohydrate Research* **117** : 185-200
- Derman A.I., J. Beckwith (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* **173** : 7719-7722
- Dylan T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas, M. Yanofsky, E. Nester, D.R. Helinski, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 4403-4407
- Errington J. (1993). *B. subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57** : 1-33
- Eyre-Walker A.(1995). The distance between *Escherichia coli* genes is related to gene expression levels. *J. Bacteriol.* **177** : 5368-5369

- Fasman G.D., W.A. Gilbert (1990). The prediction of transmembrane protein sequences and their conformation: an evaluation. *Trends Biochem. Sci.* **15** : 89-93
- Fiedler W., H. Roting (1988). Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263** : 14684-14689
- Flöckner H., A. Braxenthaler, P. Larkner, C. Jaritz, D. Ortner, M.J. Sippl (1995). Protein fold identification tool. (soumis à publication)
- Francisco J.A., C.F. Earhart, G. Georgiou (1992) Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 2713-2717
- Gaboriaud C., V. Bissery, T. Benchetrit, J.P.Mornon (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* **224** : 149-155
- Gafvelin G., G. von Heijne (1994). Topological "frustration" in multispinning *E. coli* inner membrane proteins. *Cell* **77** : 401-412
- Gibrat J.F., J. Garnier, B. Robson (1987). Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs *J. Mol. Biol.* **198** : 425-443
- Goldberg D.E., M.K. Rumley, E.P. Kennedy (1981). The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglycerol transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78** : 5513-5517
- Grossman A.D., R. Losick (1988). Extracellular control of spore formation in *B. subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 4369-4373
- Haldenwang W.G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59** : 1-30
- Hanahan D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** : 557-580
- Harkness R.E., V. Braun (1989a). Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* **264** : 6177-6182
- Harkness R.E., V. Braun (1989b). Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* **264** : 14716-14722
- Harkness R.E., W. Fiedler, V. Braun (1990). Lack of inhibition by colicin M suggests bactoprenol independence of MDO biosynthesis. *FEBS Lett.* **262** : 245-248
- Henderson P.J.F. (1993). The 12-transmembrane helix transporters. *Current Opinion Cell Biol.* **5** : 708-721

- Henderson R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K.H. Downing (1990). Model for the structure of Bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213** : 899-929
- Henikoff S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28** : 351-359
- Hennessey E.S., J.K. Broome-Smith (1994). Two related bacterial membrane proteins, ExbD and TolR, have opposite transmembrane dipolarity. *Mol. Microbiol.* **11** : 417
- Hisamatsu M., A. Amemura, K. Koizumi, T. Utamura, Y. Okada (1983). Structural studies on cyclic (1-2)-beta-D-glucans (cyclophorase) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Carbohydr. Res.* **121** : 31-40
- Holmes D.S., M. Quigley (1981). Rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Ann. Rev. Biochem.* **114** : 193
- Höltje J.-V., W. Fiedler, H. Roterling, B. Walderich, 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
- Hultgren S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. W. St. Geme, S. Normark (1993). Pilus and nonpilus bacterial adhesins : assembly and function in cell recognition. *Cell.* **73** : 887-901
- Hundle B.S., D.A. O'Brien, M. Alberti, P. Beyer, J.E. Hearst (1992). Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 9321-9325
- Ichihara S., Y. Matsubara, C. Kato, K. Akasaka, S. Mizushima (1993). Molecular cloning, sequencing, and mapping of the gene encoding protease I and characterization of proteinase and proteinase-defective *Escherichia coli* mutants. *J. Bacteriol.* **175** : 1032-1037
- Ielpi L., T. Dylan, G.S. Ditta, D.R. Helinski, S.W. Stanfield (1990). The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of β -(1 \rightarrow 2)-glucan. *J. Biol. Chem.* **265** : 2843-2851
- Ingledeew , R.K. Poole (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Review.* **48** : 222-271
- Inon de Iannino N., R.A. Ugalde (1989). Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -(1 \rightarrow 2)glucan. *J. Bacteriol.* **171** : 2842-2849
- Jackson B.J., E.P. Kennedy (1983). The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membrane-bound phosphoglycerol transferase. *J. Biol. Chem.* **258** : 2394-2398

- Jackson B.J., J.-P Bohin, E.P. Kennedy (1984). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* **160** : 976-981
- Jonas R.M., E A. Weaver, T J. Kenney, C.P. Moran, JR, W.G. Haldenwang (1988). The *B. subtilis* *spoIIG* operon encodes both σ^E and a gene necessary for σ^E activation. *J. Bacteriol.* **170** : 507-511
- Jones D.T., W.R. Taylor, J.M. Thornton (1992). A new approach to protein fold recognition. *Nature (London)* **358** : 86-89
- Jones R. A., D.M. Burns, J. Carruthers, I.R. Beacham (1993). Membrane localisation of UDP-sugar hydrolase, in *Salmonella*, is by an uncleaved N-terminal signal peptide. *FEMS Microbiol. Lett.* **114** : 299-304
- Kampfenkel K., V. Braun (1992). Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J. Bacteriol.* **174** : 5485-5487
- Kampfenkel K., V. Braun (1993). Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268** : 6050-6057
- Kennedy E.P. (1982). Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79** : 1092-1095
- Kennedy E.P. (1987). Membrane-derived oligosaccharides. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed-in-chief). Washington DC : American Society for Microbiology, pp. 672-679
- Kennedy E.P., M.K. Rumley, H. Schulman, L.M.G. van Golde (1976). Identification of sn-glycerol-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251** : 4208-4213
- Khorana H.G. (1988). *J. Biol. Chem.* **263** : 7439-7442
- Kimbrough T.G., C. Manoil (1994). Role of a small cytoplasmic domain in the establishment of serine chemoreceptor membrane topology. *J. Bacteriol.* **176** : 7118-7120
- Kosciarcz E. (1995). Approche génétique des interactions d'une glucosyltransférase membranaire avec d'autres protéines. Diplôme d'Etudes Approfondies des Sciences de la Vie et de la Santé. Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois
- Kunkel B. (1991). Compartmentalized gene expression during sporulation in *B. subtilis*. *Trends Genet.* **7** : 167-172
- Kunkel T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** : 488-492

- Kunkel T.A., J.D. Roberts, A. Zakour (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154** : 367-382
- Kyte J., R.F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** : 105-132
- Lacroix J.-M., M. Tempête, B. Menichi, J.-P. Bohin (1989). Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3** : 1173-1182
- Lacroix, J.-M. (1989). Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. Thèse de Docteur en Sciences. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay
- Lacroix, J.-M., I. Loubens, M. Tempête, B. Menichi, J.-P. Bohin (1991). The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* **5** : 1745-1753
- Lanfroy E., J.-P. Bohin (1993). Physical map location of the *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I. *J. Bacteriol.* **175** : 5736-5737
- Larsen R.A., M.G. Thomas, G E. Wood, K. Postle (1994). Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation ($\Delta V17$) by a missense mutation in ExbB. *Mol. Microbiol.* **13** : 627-640
- Lever T.M., R.J. Cogdell, J.G. Lindsay (1994). Membrane protein expression systems. A user's guide. *Edited by G.W. Gould* (Portland press, London).
- Lill R., W. Dowhan, W. Wickner (1990). The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60** : 271-280
- Liu J., C.Y. Walsh (1990). Peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from *Escherichia coli*: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** : 4028-4032
- Lopez J. M., C L. Marks, E. Freese (1979). The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *B. subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **587** : 238-252
- Losick R., P. Stragier (1992). Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355** : 601-604
- Loubens I. (1993). Biosynthèse des glucanes périplasmiques des bactéries à Gram négatif : le locus *mdoA* d'*Escherichia coli* et ses homologues chez *Pseudomonas syringae* et *Shigella flexneri*. Thèse de Docteur en Sciences. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay

- Loubens I., G. Richter, D. Mills, J.-P. Bohin (1992). A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. 491-496
- Loubens I., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix, 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 pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10** : 329-340
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-271
- Lu S., R. Halberg, L. Kroos (1990). Processing of the mother-cell σ factor, σ^K , may depend on events occurring in the forespore during *B. subtilis* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** : 9722-9726
- MaCarthy J.E.G., C. Gualerzi (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* **6** : 78-85
- Mandelstam J., S.A. Higgs (1974). Induction of sporulation during synchronised chromosome replication in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **120** : 38-42
- Mandic-Mulec I., N. Gaur, U. Bai, I. Smith (1992). Sin, a stage-specific repressor of cellular differentiation. *J. Bacteriol.* **174** : 3561-3569
- Manoil C. (1990). Analysis of protein localisation by use of gene fusions with complementary properties *J. Bacteriol.* **172** : 1035-1042
- Manoil C., J. Beckwith (1985). *TnphoA*: A transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** : 8129-8133
- Margolis P., A. Driks, R. Losick (1991). Establishment of cell type by compartmentalized activation of a transcription factor. *Science* **254** : 562-565
- Masuda E.S., H. Anaguchi, T. Sato, M. Takeuchi, Y. Kobayashi (1990). Nucleotide sequence of the sporulation gene *spoIIGA* from *B. subtilis*. *Nucleic Acids. Res.* **18** : 657
- McGovern K., M. Ehrmann, J. Beckwith (1991). Decoding signals for membrane protein assembly using alkaline phosphatase fusions. *EMBO J.* **10** : 2773-2782
- Michel H. (1983). Crystallization of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 56-59
- Michel H., R. Lancaster, G. Fritsch, U. Ermler, L. Baciou, C. Ostermeyer, S. Iwata (1995). X-ray crystallographic structure determination of membrane protein from photosynthesis and bioenergetic. *Protein Science* **4** : 11
- Miller J.H. (1992). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

- Miller K.J., R.S. Gore, 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
- Murphy C.K., V.I. Kalve, P.E. Klebba (1990). Surface topology of the *Escherichia coli* K-12 ferric enterobactin receptor. *J. Bacteriol.* **172** : 2736-2746
- Nikaido H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6** : 435-442
- Nikaido H., M. Vaara (1987). Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed-in-chief). Washington DC : American Society for Microbiology, pp. 7-22
- Nilsson IM., G. von Heijne (1990). Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein : role of positively and negatively charged amino acids. *Cell* **62** : 1135-1141
- Novick R.P. (1962). Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* **83** : 236-240
- Panagiotidis C. H., M. Reyes, A. Sievertsen, W. Boos, H.A. Schuman (1993). Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **268** : 23685-23696
- Parkinson J.S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73** : 857-871
- Partridge S.R., J. Errington (1993). The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *B. subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8** : 945-955
- Pearce S.R., M.L. Mimmack, M.P. Gallagher, U. Gileadi, S.C. Hyde, C.F. Higgins (1992). Membrane topology of the intergral membrane components, OppB et OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6** : 47-57
- Perego M., C.F. Higgins, S.R. Pearce, M.P. Gallagher, J.A. Hoch (1991). The oligopeptide transport system of *B. subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5** : 173-185
- Perego M., J.A. Hoch (1987). Isolation and sequence of the *spo0E* gene : its role in initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **1** : 125-132
- Peters H.K., W G. Haldenwang (1991). Synthesis and fractionation properties of SpoIIIGA, a protein essential for pro- σ^E processing in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **173** : 7821-7827
- Picot D., P.J. Loll, R.M. Garavito (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367** : 243-249
- Postle K., J.T. Skare (1988). *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J. Biol. Chem.* **263** : 11000-11007

- Pradel E., C.T. Parker, C.A. Schnaitman (1992) Structures of the *rfaB*, *rfaI*, *rfaJ*, and *rfaS* genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in assembly of the lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **174** : 4736-4745
- Pugsley A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57** : 50-108
- 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
- Raetz C.H. (1993). Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* **175** : 5745-5753
- Rick P.D. (1987). Lipopolysaccharides biosynthesis. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed-in-chief). Washington DC : American Society for Microbiology, pp. 648-662
- Ringquist S., S. Shinedling, D. Barrick, L. Green, J. Binkley, G.D. Stormo, L. Gold (1992). Translation initiation in *Escherichia coli* : sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* **6** : 1219-1229
- Roepe P.D., H.R. Kaback (1989). Characterization and functional reconstitution of a soluble form of the hydrophobic membrane protein lac permease from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 6087-6091
- Rost B., R. Schneider, C. Sander (1993). Progress in protein structure prediction?. *Trends Biochem. Sci.* **18** : 120-123
- Rudner D.Z., J.R. LeDeaux, K. Ireton, A.D. Grossman (1991). The *spo0K* locus of *B. subtilis* is homologous to the oligipeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* **173** : 1388-1398
- Rumley M.K., H. Th  risod, A.C. Weissborn, E.P. Kennedy (1992). Mechanisms of regulation of the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267** : 11806-11810
- Russel M., P. Model. (1984). Replacement of the *fip* gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* **159** : 1034-1039
- Russel M., S. Kidd., M.R. Kelley (1986). An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene* **45** : 333-338
- Ryter A. (1965). Etude morphologique de la sporulation de *B. subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **108** : 40-60
- Salmond G.P.C., P.J. Reeves (1993). Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18** : 7-12

- Schertler G.F.X., C. Villa, R. Henderson (1993). Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362** : 770-772
- Schifferli D.M., M.A. Alrutz (1994). Permissive linker insertions sites in the outer membrane protein of 987P fimbriae of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176** : 1099-1110
- Schindler P., G. Huber (1980). Use of PADAC, a novel chromogenic β -lactamase substrate, for the detection of β -lactamase producing organisms and assay of β -lactamase inhibitors / inactivators. in *Enzyme Inhibitors* 169-176
- Schnaitman C.A., J.D. Klena (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57** : 655-682
- Schneider E., S. Hunke, S. Tebbe (1995). The MalK protein of the ATP-binding cassette transporter for maltose of *Escherichia coli* is accessible to protease digestion from the periplasmic side of the membrane. *J. Bacteriol.* **177** : 5364-5367
- Schneider J.E., V. Reinhold, M.K. Rumley, E.P. Kennedy (1979). Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254** : 10135-10138
- Schülein R., I. Gentshev, H.-J. Mollenkopf, W. Goebel (1992). A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* **234** : 155-163
- Schulman H., 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
- Schulman H., 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
- Schwartz M. (1987). The maltose regulon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed-in-chief). Washington DC : American Society for Microbiology, pp. 1482-1502
- Shazand K., N. Frandsen, P. Stragier (1995). Cell-type specificity during development in *B. subtilis*: the molecular and morphological requirements for σ E activation. *Cell* **14** : 1439-1445
- Shechter E. (1984). Membranes biologiques. Structure, Transports, Bioénergétique. (*Editions Masson*).
- Shuman H.A., T.J. Silhavy, J. Beckwith (1980). Labeling of proteins with β -galactosidase by gene fusion. Identification of a cytoplasmic membrane component of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J. Biol. Chem.* **255** : 168-174
- Silhavy T.J., L.M. Berman, L.W. Enquist (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

- Smith R.L., J.F. O'Toole, M.E. Maguire, C.R. Sanders II (1994). Membrane topology of *Escherichia coli* diacylglycerol kinase. *J. Bacteriol.* **176** : 5459-5465
- Spratt B.G., P.J. Hedge, S. te Heesen, A. Edelman, J.K. Broome-Smith (1986). Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41** : 337-342
- Spratt B.G. (1983). Penicillin-binding proteins and the future of β -lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **129** : 1247-1260
- Stanfield S.W., L. Ielpi, D. O'Brochta, D.R. Helinski, G.S. Ditta (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1 \rightarrow 2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* **170** : 3523-3530
- Stock J.B., B. Rauch, S. Roseman (1977). Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252** : 7850-5861
- Stragier P., B. Kunkel, L. Kroos, R. Losick (1989). Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor. *Nature* **243** : 507-512
- Stragier P., C. Bonamy, C. Karmazyn-Campelli (1988). Processing of a sporulation sigma factor in *B. subtilis*: How morphological structure could control gene expression. *Cell* **52** : 697-704
- Strauch M.A., G.B. Spiegelman, M. Perego, W.C. Johnson, D. Burbulys, J.A. Hoch (1989). The transition state transcription regulator *abrB* of *B. subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J.* **8** : 1615-1621
- Sugiyama J., S. Mahmoodian, G.R. Jacobson (1991). Membrane topology analysis of *Escherichia coli* mannitol permease by using a nested-deletion method to create *mtlA-phoA* fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 9603-9607
- Tabor S., C.C. Richardson (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase / promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** : 1074-1078
- Talaga P., B. Fournet, J.-P. Bohin (1994). Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176** : 6538-6544
- Tartakoff A.M., N Singh (1992). How to make a glycoinositol phospholipid anchor. *Trends Biochem. Sci.* **17** : 470-473
- Therisod H., 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. U.S.A.* **84** : 8235-8238
- Tolmasky M.E., R.J. Staneloni, L.F. Leloir (1982). Lipid-bound saccharides in *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257** : 6751-6757

- Tolner B., T. Ubbink-Kok, B. Poolman, W.N. Konings (1995). Characterization of the proton / glutamate symport protein of *B. subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177** : 2863-2869
- Traxler B., C. Lee, D. Boyd, J. Beckwith (1992). The dynamics of assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267** : 5339-5345
- Traxler B., J. Beckwith (1992). Assembly of a hetero-oligomeric membrane protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 10852-10856
- Uhland K., R. Ehrle, T. Zander, M. Ehrmann (1994). Requirements for translocation of periplasmic domains in polytopic membrane proteins. *J. Bacteriol.* **176** : 4565-4571
- Ujwal M.L., M. Sahin-Tóth, B. Persson, H.R. Kaback (1994). Role of glutamate-269 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Mol. Memb. Biol.* **11** : 9-16
- van Golde L.M., H. Schulman, E.P. Kennedy (1973). Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70** : 1368-1372
- Van Hoy B.E., J.A. Hoch (1990). Characterization of the *spoIVB* and *recN* loci in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **172** : 1306-1311
- Vianney A., T.M. Lewin, W.F. Beyer, Jr., J.-C. Lazzaroni R. Portalier, R.E. Webster (1994). Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **176** : 822-829
- Vidwans S J., K. Ireton, A.D. Grossman (1995). Possible role for the essential GTP-binding protein Obg in regulating the initiation of sporulation in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **177** : 3308-3311
- Vidwans S.J., K. Ireton, A.D. Grossman (1995). Possible role for the essential GTP-binding protein Obg in regulating the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177** : 3308-3311
- Vieira J., J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19** : 259-268
- Viitanen P. V., M.J. Newman, D.L. Foster, T.H. Wilson, H.R. Kaback (1985). Purification, reconstitution, and characterization of the Lac permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **125** : 429-452
- Vinopal R.T., J.D. Hillman, H. Schulman, W.S. Reznikoff, D.G. Fraenkel (1975). New phosphoglucose isomerase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122** : 1172-1174
- von Heijne G. (1982). Membrane protein structure prediction : hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225** : 487-494

- von Heijne G. (1986). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5** : 3021-3027
- Walker J.E., M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosine, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1** : 945-951
- Webster R.E. (1991). The tol gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5** : 1005-1011
- Wedekind J.E., P.A. Frey, I. Rayment (1995). Three dimensional structure of galactose-1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli* at 1,8 Å resolution. *Biochemistry* **34** : 11049-11061
- Weiner J.H., G. Shaw, R.J. Turner, C. Trieber (1993) The topology of the anchor subunit of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268** : 3238-3244
- Weir J., M. Predich, E. Dubnau, G. Nair, I. Smith (1991). Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *B. subtilis* σ^H factor. *J. Bacteriol.* **173** : 521-529
- Weisgerber C., F.A. Troy (1990). Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. *J. Biol. Chem.* **265** : 1578-1587
- Weissborn A.C., E.P. Kennedy (1984). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of β 1 \rightarrow 2-linked polyglucose chains. *J. Biol. Chem.* **259** : 12644-12651
- Weissborn A.C., M.K. Rumley, E.P. Kennedy (1991). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Membrane-bound glucosyltransferase system from *Escherichia coli* requires polyprenyl phosphate. *J. Biol. Chem.* **266** : 8062-8067
- Whitfield C., D.A. Adams, F.A. Troy (1984). Biosynthesis and assembly of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. Role of a low-density vesicle fraction in activation of the endogenous synthesis of sialyl polymers. *J. Biol. Chem.* **259** : 12769-12775
- Whitley P., T. Zander, M. Ehrmann, M. Haardt, E. Bremer, G. von Heijne (1994). Sec-independent translocation of a 100-residue periplasmic N-terminal tail in the *E. coli* inner membrane protein proW. *EMBO J.* **13** : 4653-4661
- Williams P., B.W. Russel, G. Richter, P. Talaga, J.-P. Bohin, D. Mills (1994). Gene products encoded by the *mdoA* operon of *Escherichia coli* and the *hrpM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* are isofunctional (affiche)
- Zorreguieta A., R.A. Geremia, S. Cavaignac, G.A. Cangelosi, E.W. Nester, R.A. Ugalde (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1** : 121-127

Zorreguieta A., 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

8 - RESUME

INTRODUCTION

Chez *Escherichia coli*, les glucanes périplasmiques osmorégulés (G. P. O.) sont appelés MDO (Membrane Derived Oligosaccharides). La quantité de MDO augmente lorsque l'osmolarité du milieu diminue. Ces glucanes peuvent ainsi représenter jusqu'à 5% du poids sec des bactéries. La structure du MDO est articulée autour d'un squelette linéaire de glucose liés en β , 1-2 et ramifié par des liaisons en β , 1-6, sur lequel sont placés différents substituants (*sn*-1-phosphoglycérol, phosphoéthanolamine et plus rarement succinate). L'opéron *mdoGH*, osmorégulé au niveau de la transcription, est impliqué dans l'assemblage du squelette glucidique, et une mutation dans l'un ou l'autre de ces deux gènes suffit à abolir la synthèse des molécules de MDO. La protéine MdoG est localisée dans le périplasma, et sa fonction reste inconnue. La protéine MdoH est nécessaire à une activité glucosyltransférase *in vitro*. Cette activité, liée à la membrane, utilise l'UDP-glucose comme précurseur, un octyl-glucoside comme amorce, et l'« ACP » (Acyl Carrier Protein). Ce système est indépendant vis-à-vis de la protéine MdoG. Enfin, les produits obtenus par ce test ne sont constitués que de chaînes de glucoses linéaires liés en β , 1-2.

Des études menées dans la famille des Rhizobiacées ont permis d'impliquer directement les glucanes périplasmiques dans les mécanismes d'interactions entre ces bactéries et leurs hôtes. Dernièrement, il a été mis en évidence une très forte homologie (69% d'identité sur 3264 nucléotides) entre un locus de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, responsable de la virulence de cette bactérie vis-à-vis des plantes, et le locus *mdoGH* d'*E. coli*. Cette très forte identité permet d'obtenir une complémentation interspécifique.

TRAVAUX REALISES

Le but de mon travail était de confirmer expérimentalement la localisation membranaire de la protéine MdoH et d'en effectuer une étude topographique par la technique de fusion de gènes avec la β -lactamase. Ensuite, je devais exploiter ces résultats pour mieux cerner la ou les activités de cette protéine.

Etude de l'expression du gène *mdoH*

La séquence nucléotidique de l'opéron *mdoGH* nous avait appris que le premier codon du gène *mdoH* pouvait être situé à 3 endroits différents. L'un de ceux-ci (AUG) chevauchant le dernier codon du gène *mdoG*, on pouvait penser à un couplage traductionnel fort, d'autant que ce codon est dépourvu d'une séquence typique de Shine et Dalgarno. Pour savoir si tel était le cas, j'ai réalisé une

interruption du cadre de lecture du gène *mdoG* en des sites de restriction adéquats, à deux endroits différents. Dans les deux cas la protéine MdoH est toujours exprimée, alors que dans un cas la protéine MdoG ne peut plus compléter une mutation de la copie chromosomique du gène *mdoG*, et dans l'autre cas la complémentation a lieu à un niveau inférieur (0,7 fois) à celui obtenu avec un copie sauvage du gène *mdoG*. Il semble donc, qu'il n'existe pas de couplage traductionnel fort entre *mdoG* et *mdoH*.

D'autre part, j'ai réalisé le sous-clonage moléculaire du gène *mdoH* dans un plasmide à copies multiples, afin de le placer sous le contrôle d'un dérivé du promoteur de l'opéron lactose, le promoteur *placUV5*. L'introduction de ce plasmide dans des souches mutées au locus *mdoH* permet de rétablir la biosynthèse du MDO en augmentant sa quantité de 1,5 fois. Le clonage du même fragment dans le sens opposé, contre le promoteur *placUV5*, permet aussi le rétablissement de la biosynthèse de MDO mais à un niveau moindre (0,5 fois). Il semble donc que le fragment cloné puisse permettre une expression de la protéine MdoH grâce à la présence d'un promoteur secondaire faible. L'existence de ce promoteur a été renforcée par le clonage de l'interposon oméga en amont de la partie 5' du gène *mdoH*. Cet interposon est muni de séquences de terminaison de la transcription et de la traduction. Cette construction permet toujours au plasmide de rétablir, à un niveau inférieur au niveau sauvage, la biosynthèse du MDO.

Enfin, j'ai réalisé le marquage, à la méthionine ³⁵S, de la protéine MdoH et de 3 protéines MdoH tronquées. La taille de la plus courte de ces protéines m'a permis de confirmer que le premier codon de MdoH est celui qui est chevauchant avec le codon stop de MdoG. Ainsi la protéine MdoH est constitué de 847 résidus. Sa composition en acides aminés fait apparaître un pourcentage important de résidus hydrophobes pouvant expliquer la migration anormale de cette protéine dans des conditions dénaturantes.

Etude de l'activité de la protéine MdoH

Le système *in vitro* ne permet d'obtenir que des molécules linéaires de glucose liés en β , 1-2. Il nous semblait donc important de tenter de mettre au point une autre technique, pour non seulement révéler l'activité de MdoH, mais aussi obtenir des produits dont la structure est plus proche, voir identique à celle du MDO. En effet, on ne sait pas comment s'effectue le passage d'une chaîne linéaire, à priori cytoplasmique, à une molécule ramifiée et localisée dans le périplasme. Cette nouvelle technique consiste à perméabiliser les cellules puis à les incuber en présence d'UDP-glucose radioactif. Les souches utilisées (*galU*) ne peuvent pas convertir l'UDP-glucose en glucose 1-P et inversement. Les premiers résultats, nous indiquent que cette approche permet d'obtenir un produit

dont une analyse sommaire nous indique qu'il est semblable au MDO. De plus, une mutation *mdoG* ou une mutation *mdoH* ont le même effet, c'est à dire la disparition du produit homologue au MDO. Ce nouveau test a donc d'ores et déjà aboutit à une connaissance supplémentaire par rapport au système *in vitro* puisque la protéine MdoG est absolument nécessaire dès les premières étapes de la voie de biosynthèse du MDO.

Etude topographique de la protéine MdoH

Le profil d'hydrophobicité de la protéine MdoH, obtenu par la méthode de Kyte et Doolittle, se révèle complexe, puisqu'il alterne irrégulièrement de grandes régions hydrophiles et hydrophobes. Dans le but de déterminer la localisation puis la topographie de la protéine MdoH nous avons choisi de construire des protéines de fusion entre MdoH et la β -lactamase. Cette technique est basée sur la construction d'un grand nombre de fusions aléatoires entre le gène étudié et le gène *blaM* tronqué (cette version tronquée code la β -lactamase déletée de sa séquence signal). Les protéines de fusion ainsi obtenues peuvent conduire à une localisation cytoplasmique ou périplasmique de la partie β -lactamase. Cette différence de localisation est facilement identifiable par la mesure de la capacité à former des colonies isolées en présence d'ampicilline.

Dans un premier temps, j'ai construit grâce à des sites de restrictions adéquats, 3 protéines de fusion entre MdoH et la β -lactamase. J'ai pu ainsi, d'une part vérifier que de telles protéines pouvaient s'exprimer correctement, et d'autre part montrer que l'activité β -lactamase de ces protéines de fusion était liée à la membrane. Le séquençage nucléotidique de 51 fusions m'a permis d'établir la topographie complète de la protéine MdoH. L'extrémité aminée (du premier acide aminé au numéro 140 environ) est cytoplasmique ainsi que le grand domaine central (du numéro 200 au numéro 500) et l'extrémité carboxylique (du numéro 700 au numéro 847). Ces trois régions sont séparées par 8 segments transmembranaires, dont 2 séparent l'extrémité aminée du domaine central, et 6 séparent le domaine central de l'extrémité carboxylique. Enfin, seulement deux petits domaines de 28 et 32 acides aminés sont situés dans le périplasma. Ces résultats montrent que les principaux domaines de la protéine MdoH sont cytoplasmiques et qu'ainsi le ou les sites catalytiques sont probablement situés dans le cytoplasme. Cela est en concordance avec le fait que l'UDP-glucose, unique précurseur du MDO, est présent exclusivement dans le cytoplasme d'*E. coli*. Il ne faut pas cependant négliger l'importance des deux régions périplasmiques. En effet, l'insertion d'un oligonucléotide au niveau de la deuxième boucle périplasmique provoque une diminution de 75% de la quantité de MDO synthétisée. Cette région pourrait donc jouer un rôle dans des interactions protéine-protéine entre MdoH et des protéines périplasmiques, MdoG par exemple

La construction de ces multiples fusions de gènes m'a permis d'autre part d'obtenir une protéine de fusion qui complémente une mutation de la copie chromosomique du gène *mdoH*. Cette fusion est située à l'extrémité carboxylique de MdoH au niveau de l'acide aminé 833. La complémentation de la mutation est en tout point identique à celle obtenue par l'expression du gène sauvage sous le contrôle du promoteur *placUV5*. J'ai aussi testé des fusions dont la part du gène *mdoH* est plus courte, mais aucune n'a permis de rétablir de la même façon la biosynthèse du MDO. D'autre part, au laboratoire il avait été construit, lors du clonage moléculaire du locus *mdoGH*, une délétion de la partie 3' de *mdoH* qui aboutissait à l'inactivation de ce gène. J'ai séquencé ce point de délétion et il a été trouvé un codon stop provoquant l'expression d'une protéine tronquée d'exactly 818 acides aminés. La conclusion de ces observations est que la région située entre les acides aminés 818 et 833 est impliquée dans l'activité de MdoH.

Dans le domaine cytoplasmique central, l'identité avec le produit du gène *hrpM* devient particulièrement importante à partir d'une séquence d'acides aminés singulière, une succession de 6 résidus arginine. Afin de vérifier que cette séquence avait un rôle particulier, j'ai réalisé une mutagenèse dirigée pour remplacer le troisième résidu arginine par un résidu alanine. Cette mutation a pour effet de diminuer de 20% la quantité de MDO, et n'a aucun effet sur la régulation osmotique.

Enfin, une collaboration avec le groupe du professeur G. Vergoten nous a apporté des précisions sur l'organisation tridimensionnelle du domaine central cytoplasmique. Cette organisation est de type α/β .



CONCLUSIONS

L'établissement de la topographie de la protéine MdoH a permis de mettre en évidence qu'il s'agit d'une protéine intégrée dans la membrane cytoplasmique. A ce titre, elle pourrait grâce à ces 8 segments transmembranaires jouer une fonction dans la translocation des molécules naissantes de MDO. Ces molécules naissantes seraient alors exportées vers le périplasme dans une étape nécessitant la protéine MdoG. Celle-ci pourrait jouer, en interaction avec MdoH, un rôle dans la ramification du squelette lors de son apparition dans le périplasme, et/ou dans le contrôle de la quantité de molécules synthétisées, exportées par MdoH.