

g... 2000 = 482

50376
1996
109

N° d'ordre :

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

Philippe TALAGA

SUJET : Les glucanes périplasmiques osmorégulés :
structure et biodiversité.

Soutenue le 25 Mars 1996 devant la commission d'examen

Président	M. André VERBERT
Rapporteurs	M. Jean-Claude PROMÉ M. François TARAVEL
Examineurs	M. Guy LIPPENS M. Jean-Pierre BOHIN



Je dédie cette thèse à la mémoire de Bernard FOURNET.

A Dorothée pour son amour, ses conseils, et sa patience.

A mes parents et à mes grands parents pour m'avoir encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur André VERBERT pour m'avoir accueilli dans l'UMR 111 et pour son gros coup de pouce dans la recherche de mon stage post-doctoral.

Je remercie Jean-Pierre BOHIN « J'ai fait encore plus fort depuis » pour avoir eu confiance en moi et me laisser continuer dans la voie que j'avais choisie. Il m'a fait découvrir et apprécier ces univers étranges que sont la microbiologie et la biologie moléculaire. Surtout, merci d'avoir accueilli un « sucrier » au sein de ton équipe.

Je remercie également Guy LIPPENS pour avoir eu la patience de m'initier à la RMN, pour nos discussions, et pour son accueil lors de mes fréquentes visites au sein du laboratoire de RMN de l'I.P.L.

Je suis sensible à l'honneur que me font Messieurs Jean-Claude PROME et François TARAVEL en participant à mon jury, et je les en remercie vivement.

Merci à tous mes collègues du « 002 » (par ordre alphabétique) : Anne pour avoir sauvé tous les champs de pomme de terre du Nord de la France en cultivant « les méchantes bêtes », Eric avec qui j'ai partagé les bons et les mauvais moments tout au long de cette thèse, Frédéric pour son romantisme, Isabelle pour toutes nos discussions, Jean-Marie pour m'avoir initié à la microbiologie, Laurent pour ces conseils pour préparer mon départ, Sabine pour sa disponibilité et son enthousiasme, et Silvia pour sa bonne humeur et son initiation à l'espagnol.

Merci à toutes les personnes du « C9 » et du « C4 ». Tous m'ont aidé à un moment ou un autre, d'une manière ou d'une autre. Merci surtout pour l'ambiance unique qui règne au sein du laboratoire. Je n'oublie pas tous les membres de l'ex « 107 » avec qui j'ai partagé un moment très difficile. Un merci tout particulier à Thierry FONTAINE pour m'avoir initié à la paillasse et à Jean-Michel WIERUSZESKI pour m'avoir enseigné l'utilisation de cette « machine magique » qu'est l'appareil RMN.

Je remercie Bernd STAHL pour sa collaboration. Sans lui cette thèse ne serait pas la même. Je tiens à le remercier d'avoir toujours été disponible et pour nos longues conversations au téléphone qui ont fait découvrir au laboratoire mon accent anglais « chti'mi ».

*Je remercie Microsoft pour Word6, Intel pour son microprocesseur, Nirvana pour mes torticolis, et *E. coli*, *E. chrysanthemi*, *P. syringae*, *B. solanacearum*, *X. campestris*, *A. brasilense*, et *R. sphaeroides* pour leurs glucanes.*

Abréviations

LPS : lipopolysaccharides

OPG : osmoregulated periplasmic glucans

EPS : exopolysaccharides

MDO : membrane derived oligosaccharides

ACP : acyl carrier protein

HPAEC : high-performance anion-exchange chromatography

FAB : fast atom bombardment

MS : mass spectrometry

MALDI : matrix-assisted laser desorption/ionization

GC : gas liquid chromatography

DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque

AQU : 3-aminoquinoline

SU : acide succinique

PE : phosphoéthanolamine

PG : phosphoglycérol

RMN : résonance magnétique nucléaire

1D : one-dimensionnal

2D : two-dimensionnal

COSY : correlation spectroscopy

HMBC : heteronuclear multiple bond correlation

TOCSY : total correlation spectroscopy

HSQC : heteronuclear single quantum coherence

NOESY : nuclear Overhauser effect spectroscopy

HMQC : heteronuclear multiple quantum coherence

HPLC : high-pressure liquid chromatography

Publications

Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin. 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:6538-6544.

Talaga, P., B. Stahl, J.-M. Wieruszkeski, F. Hillenkamp, S. Tsuyumu, G. Lippens, and J.-P. Bohin. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *X. campestris* pv. *citiri*: a new family of periplasmic glucans. Accepté pour publication dans *J. Bacteriol.*

Lippens, G., J.-M. Wieruszkeski, P. Talaga, J.-P. Bohin, and H. Desvaux. Accurate measurement of interglycosidic distances in the cyclic glucan of *Burkholderia solanacearum*. Soumis à *J. Am. Chem. Soc.*

Chauveau, C., P. Talaga, J.-M. Wieruszkeski, G. Strecker, and L. Chavant. Isolation and structure of a water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus* (Fries). Soumis à *Phytochem.*

En préparation

Stahl, B., P. Talaga, J. Stahl-Zeng, F. Hillenkamp, and J.-P. Bohin. Highly heterogeneous bacterial periplasmic glucans as revealed by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. En préparation pour *Anal. Biochem.*

Talaga, P., J.-M. Wieruszkeski, B. Stahl, G. Lippens, and J.-P. Bohin. Osmoregulated periplasmic glucans of *Rhodobacter sphaeroides*. En préparation pour *J. Biol. Chem.*

Page, F., P. Talaga, S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J. Robert-Baudoy, and J.-P. Bohin. Periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*: structural analysis and molecular cloning of the biosynthetic genes. En préparation pour *Mol. Microb.*

Williams, P., P. Talaga, A. Bohin, B. W. Russel, I. Loubens, G. Richter, J.-P. Bohin and D. Mills. The *mdoGH* operon of *E. coli* and the *hrpM* locus of *P. syringae* pv. *syringae* encodes isofunctional proteins. En préparation pour *J. Bacteriol.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
I) L'enveloppe des bactéries et des archéons	5
A) Les composés glucidiques de l'enveloppe	5
1) La muréine	5
2) Le lipopolysaccharide	7
3) Les glucanes périplasmiques osmorégulés	10
4) Les exopolysaccharides composant la capsule	11
5) L'enveloppe des bactéries acido-alcool-résistantes	11
6) Les couches de surfaces cristallines	12
7) Les acides teichoïques	13
II) Implications de l'enveloppe dans les interactions bactérie-plante	14
A) Quelques exemples d'interaction avec des plantes	14
1) La phytopathogenèse bactérienne	14
2) La phytopathogenèse d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3) La symbiose des <i>Rhizobium</i>	16
B) Les composants glucidiques de l'enveloppe comme facteurs d'interaction	17
1) Le rôle des exopolysaccharides	17
a) Le rôle des EPS dans la symbiose étroite	17
b) Le rôle des EPS dans le pouvoir phytopathogène	19
2) Le rôle du lipopolysaccharide	21
a) Le rôle du LPS dans la symbiose	21
b) Le rôle du LPS dans la pathogénicité	21
III) Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)	23
A) Les OPG d' <i>Escherichia coli</i>	23
1) La découverte et la structure des OPG d' <i>E. coli</i>	23
2) Les substituants du MDO	24
3) La biosynthèse du MDO est osmorégulée	24
4) La biosynthèse du MDO	26
a) Biosynthèse <i>in vivo</i> : un modèle de travail	26
b) Le locus chromosomique <i>mdoGH</i> est responsable de la biosynthèse des OPG chez <i>E. coli</i>	29
c) Le locus <i>mdoGH</i> est conservé chez <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	30
B) Les OPG des <i>Rhizobiaceae</i>	32
1) Les structure des glucanes cycliques liés en β -1,2	32
2) Les structures des glucanes cycliques liés en β -1,6 et β -1,3	33
3) Les substituants des OPG des <i>Rhizobiaceae</i>	36
4) La biosynthèse des OPG des <i>Rhizobiaceae</i>	37
a) Biosynthèse <i>in vitro</i> : le système glucosyl-transférase	37
b) Deux locus chromosomiques sont responsables de la synthèse des glucanes cycliques liés en β -1,2	38
c) Les protéines NdvA/ChvA sont impliquées dans le transport des OPG	39
d) Les protéines NdvB/ChvB synthétisent les glucanes cycliques liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose	39
C) Les OPG synthétisés par d'autres bactéries	40
D) Les fonctions possibles des OPG	40
1) Le rôle des OPG dans l'adaptation à l'osmolarité	40
2) Le rôle des OPG dans les processus d'infection de la plante	41
3) Le rôle des OPG dans l'intégrité de l'enveloppe	42
But de ce travail	43

RESULTATS	44
I) Etudes des complémentations intergénériques utilisant les gènes <i>hrpM</i> et <i>mdoH</i>	45
A) Effet de la complémentation de <i>mdoH</i> par <i>hrpM</i> sur la structure des OPG formés.	46
1) Purification et analyse par tamisage moléculaire	46
2) Comparaison du squelette glucidique	46
3) Comparaison du degré de substitution	50
a) Détermination du rapport glucose/phosphoglycérol	50
b) Comparaison des OPG formés par l'analyse en HPAEC à haut pH	50
c) Comparaison des OPG formés par l'analyse en HPAEC à pH 5,5	50
B) <i>mdoH</i> restaure la synthèse des OPG chez un mutant <i>hrpM</i> de <i>P. syringae</i>	54
II) Etude de la structure des OPG synthétisés par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>.	56
III) Vers une analyse systématique des OPG	58
A) Analyse des OPG d' <i>E. coli</i> par spectrométrie de masse	59
B) Analyse des OPG d' <i>E. chrysanthemi</i> par spectrométrie de masse	60
C) Analyse des OPG par HPAEC	60
D) Etude de la régulation des OPG d' <i>E. chrysanthemi</i> .	73
1) Purification et analyse par tamisage moléculaire	73
2) Analyse par MALDI-MS et par RMN	73
E) Conclusion	77
IV) <i>E. coli</i>, <i>E. chrysanthemi</i>, et <i>P. syringae</i> synthétisent une même famille d'OPG	78
A) Comparaison de la quantité d'OPG synthétisés	78
B) Comparaison du squelette glucidique	79
1) Analyse par méthylation	79
2) Analyse par MALDI-MS	80
3) Analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions.	80
C) Etude par RMN	83
1) Etude par RMN du ¹ H	83
2) Etude par RMN du ¹³ C	83
V) Etude de la structure des glucanes associés à <i>Burkholderia solanacearum</i> et <i>Xanthomonas campestris</i>.	88
VI) Etude de la structure des OPG synthétisés par <i>Azospirillum brasilense</i>	90
A) Purification et analyse par tamisage moléculaire	90
B) Analyse par MALDI-MS et par RMN du proton	90
C) Séparation des OPG désubstitués par HPAEC	93
D) Analyse par MALDI-MS de chacun des glucanes	96
E) Analyse par RMN de chacun des glucanes	96
VII) Etude de la structure des glucanes associés à <i>Rhodobacter sphaeroides</i>.	102
A) Purification et analyse par tamisage moléculaire	102
B) Analyse par MALDI-MS et par RMN du proton	102
C) Analyse par RMN des glucanes désubstitués	106
1) Analyse par RMN du proton	106
2) Analyse par RMN homonucléaire	106
3) Analyse par RMN hétéronucléaire	108
CONCLUSIONS	120
I) La détermination d'une nouvelle famille d'OPG	121
II) Des gènes conservés, donc des protéines similaires synthétisent des OPG similaires	123
III) Les relations structures-fonctions des OPG	125

FICHES TECHNIQUES	127
Fiche technique n°1	128
1) Souches et milieux	128
2) Détermination du rapport glucose/glycérol des OPG	128
Fiche technique n°2	130
1) Extraction des OPG	130
a) Méthode d'extraction à l'éthanol	130
b) Méthode d'extraction à l'acide trichloroacétique	130
2) Purification des OPG	130
a) Dessalage sur Sephadex G15	130
b) Chromatographie de gel filtration	130
Fiche technique n°3	132
1) Détermination du rapport molaire en monosaccharides des OPG	132
2) Analyse des liaisons glycosidiques des OPG par méthylation	132
Fiche technique n°4	134
1) Analyse des OPG par acétolyse	134
2) Traitement des OPG par l'HF aqueux	134
Fiche technique n°5	135
1) Chromatographie haute performance d'échange d'anions des OPG	135
a) Chromatographie à haut pH	135
b) Chromatographie à pH 5,5	135
Fiche technique n°6	136
1) Analyse des OPG par spectrométrie de masse	136
a) Spectrométrie de masse en mode FAB	136
b) Spectrométrie de masse en mode ionisation/désorption laser	136
Fiche technique n°7	137
1) Analyse par résonance magnétique nucléaire des OPG	137
 BIBLIOGRAPHIE	 138
 RESUME	 150

INTRODUCTION

I) L'enveloppe des bactéries et des archéons

L'utilisation de techniques nouvelles, et notamment l'analyse de la séquence des ARN ribosomiques (ARNr), a permis de classer les différents êtres vivants en fonction de critères moléculaires et non plus cellulaires. Ces comparaisons moléculaires ont permis de montrer que la vie sur la terre peut être divisée en trois « domaines » bien distincts : les bactéries, les archéons et les eucaryotes (Woese et coll., 1990). Les différences entre ces trois domaines sont beaucoup plus profondes que les anciennes divisions communément admises tels que celles des cinq règnes (animaux, plantes, champignons, protistes et procaryotes) ou la dichotomie eucaryotes-procaryotes.

C'est d'abord à leur surface que toutes les cellules perçoivent les caractéristiques de leur environnement. L'enveloppe cellulaire est le reflet des stratégies adaptatives de chacun de ces organismes. Il existe, par exemple, une différence considérable dans la structure des enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (figure 1). En effet, les bactéries à Gram positif possèdent une membrane cytoplasmique recouverte d'une paroi épaisse formée d'un grand nombre de couches de peptidoglycane. Les bactéries à Gram négatif, quant à elles, possèdent une membrane externe qui entoure une paroi moins épaisse de peptidoglycane. Cette membrane externe joue le rôle d'une véritable barrière de protection de la membrane cytoplasmique des cellules. Ces deux membranes délimitent un compartiment cellulaire dénommé périplasma dont le volume varie selon les conditions de croissance des bactéries et l'état physiologique de la cellule. Le périplasma peut occuper jusqu'à 40 % du volume cellulaire total dans les conditions de croissance bactérienne utilisées couramment au laboratoire (Stock et coll., 1977). Ce compartiment possède des fonctions de détoxification, de transport, de recyclage, et de synthèse.

L'enveloppe des archéons et des bactéries possède de nombreux composés glucidiques qu'il est important de définir, ceci afin de mieux comprendre leurs fonctions éventuelles.

A) Les composés glucidiques de l'enveloppe

1) La muréine

La muréine est un peptidoglycane rencontré dans toutes les bactéries, à Gram positif comme à Gram négatif, à l'exception des bactéries dépourvues de paroi, connues sous le nom de mollicutes.

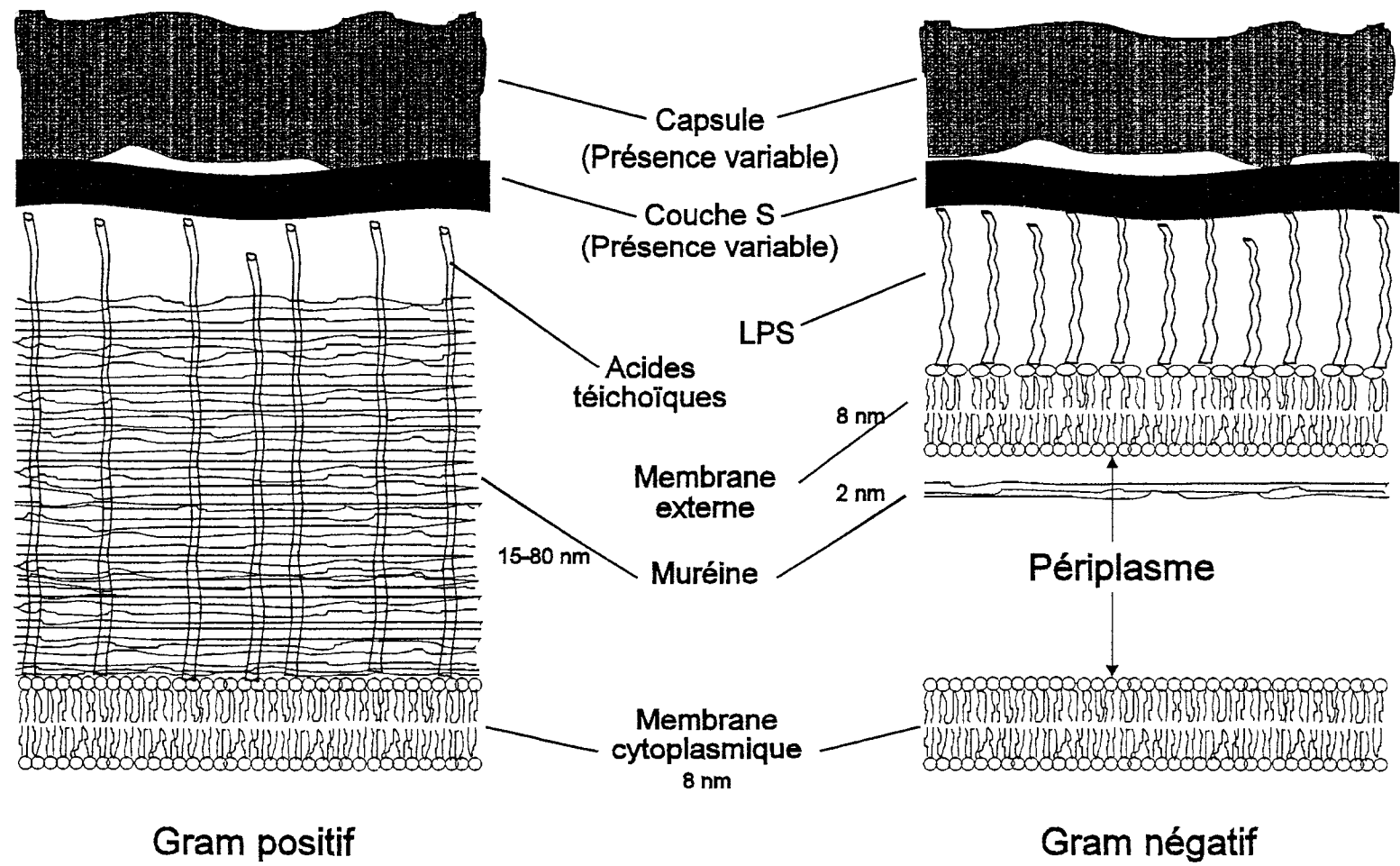


Figure 1 : comparaison de la structure des enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

La muréine est absente chez les archéons et les eucaryotes. Elle constitue chez les bactéries à Gram positif la majeure partie de la paroi. Bien que présente en moindre quantité chez les bactéries à Gram négatif, elle joue malgré tout le rôle principal dans le maintien de l'intégrité structurale de la cellule. De par sa rigidité, elle donne sa forme à la cellule, tout en lui permettant de résister aux pressions extérieures, dans un milieu hypotonique par exemple. La paroi des bactéries à Gram positif consiste en une épaisse couche multimoléculaire de muréine, celle des bactéries à Gram négatif contient deux couches monomoléculaires de peptidoglycane en phase exponentielle de croissance et trois en phase stationnaire.

La molécule de peptidoglycane (figure 2) est une molécule complexe formée 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 liés en β -1,4. Chez *Escherichia coli*, le térapeptide est constitué de L-alanine, de D-glutamine, d'acide méso-diaminopimélique (DAP) et de D-alanine. Les térapeptides sont reliés et participent à l'édification de la molécule réticulée de peptidoglycane, formant un gel plus ou moins épais. Chez d'autres espèces, la muréine peut différer par la nature des acides aminés en position 2 et 3 du térapeptide, et par la nature ainsi que par la fréquence des liaisons entre chaînes.

2) Le lipopolysaccharide

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui entoure la fine paroi de peptidoglycane. L'organisation de la membrane externe est fortement asymétrique car son feuillet externe possède un constituant particulier à la place des phospholipides. Ce composé est le lipopolysaccharide bactérien (LPS), une molécule complexe qu'on ne trouve pas ailleurs dans la nature. Le résultat est que les feuillettes de cette membrane sont extrêmement asymétriques, et que les propriétés de cette double couche inhabituelle diffèrent considérablement de celles d'une membrane biologique normale.

Le LPS (figure 3) est constitué de trois parties distinctes :

- Un lipide, appelé lipide A, forme le feuillet externe de la membrane externe. Le lipide A est un glycolipide inhabituel, dans la mesure où les acides gras qui sont attachés au disaccharide, constitué de deux unités de N-acétylglucosamines liées par une liaison β -1,6, sont plus courts que ceux des phospholipides (une longueur de 14 carbones au lieu des 16 à 18 communément rencontrée) ; tous ces acides gras sont saturés et peuvent être substitués par des groupements hydroxyles. De plus, des résidus de phosphate peuvent être attachés au disaccharide.

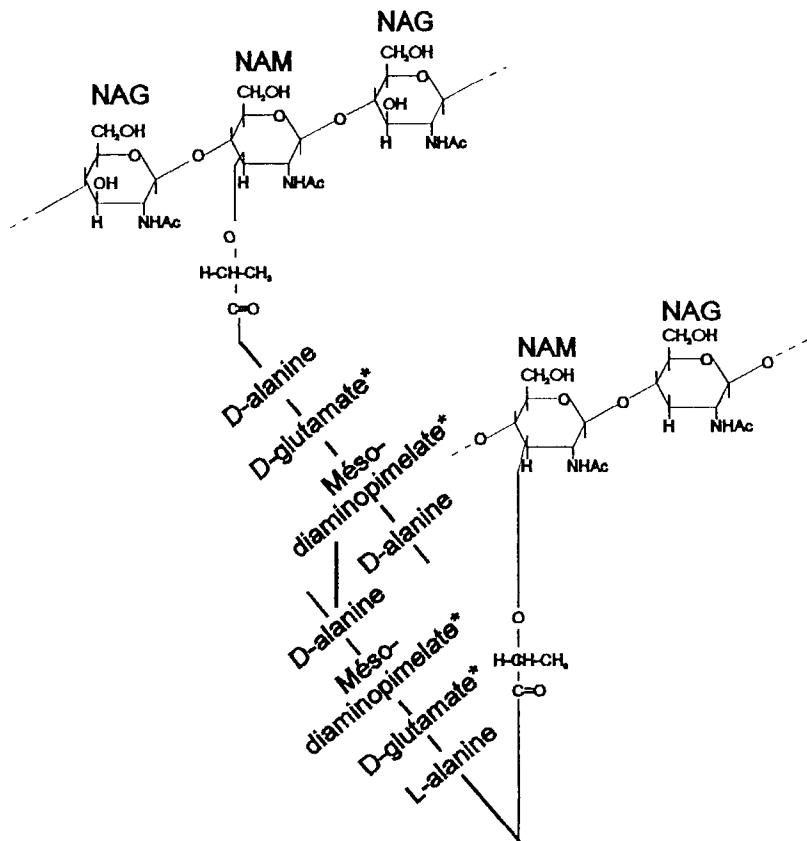


Figure 2 : Diagramme représentant la structure de la muréine d'*E. coli*.

Chez d'autres espèces, la muréine peut différer par la nature des acides aminés en positions 2 et 3 du térapeptide (indiqués par des astérisques dans la figure), et par celle des liaisons entre chaînes ainsi que par leur fréquence.

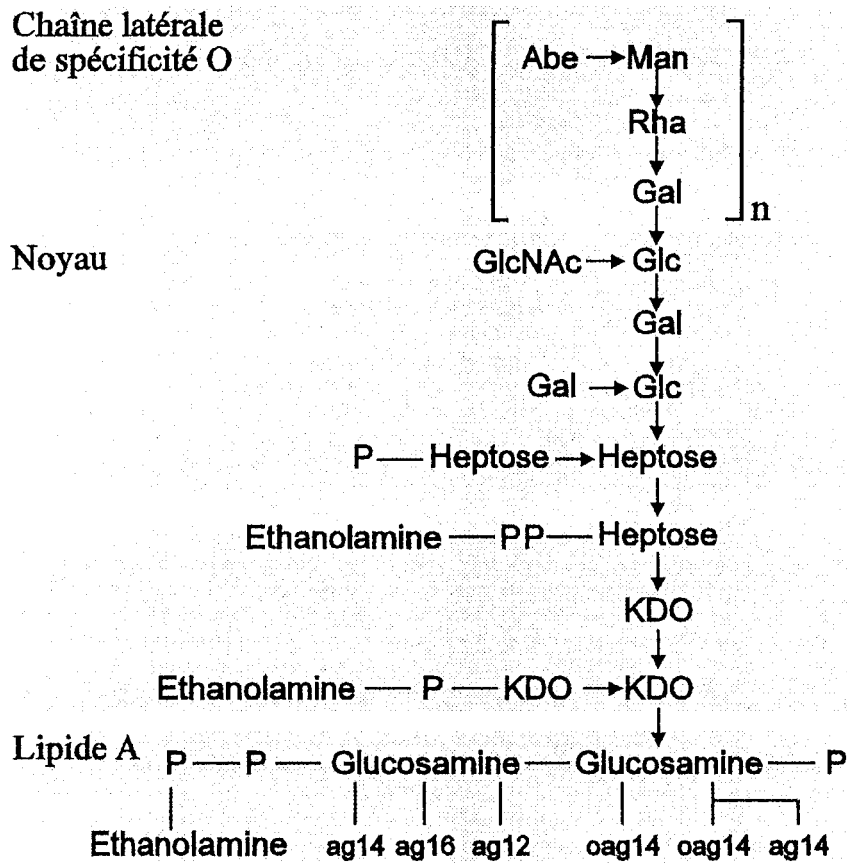


Figure 3 : représentation schématique d'une sous-unité de lipopolysaccharide de *Salmonella typhimurium*.

La chaîne latérale de spécificité O est habituellement plus longue que le noyau ; elle consiste en un grand nombre de répétitions de sous-unités tri-, tétra-, ou pentasaccharidiques qui comportent (selon les espèces) toute une série de sucres inhabituels. Le lipide A et le noyau sont assez semblables selon les espèces entériques alors que la chaîne latérale est très spécifique de chaque souche.

- Une courte série de sucres constitue la partie centrale ou noyau. Il contient deux sucres spécifiques du LPS : le KDO (acide 3-désoxy-D-manoctulosonique) et un heptose (le L-glycéro-D-mannoheptose). Il contient aussi divers sucres plus communs, comme le glucose, le galactose, et la N-acétyl-D-glucosamine. Sa structure est relativement constante parmi les bactéries à Gram négatif.

- Une longue chaîne glucidique, dont la longueur peut atteindre 40 sucres, constitue l'antigène O. Les chaînes glucidiques hydrophiles de l'antigène O couvrent la surface de la bactérie et sont très efficaces pour repousser les composés hydrophobes. Si la structure du lipide A est très conservée parmi les bactéries à Gram négatif, la structure de l'antigène O est, au contraire, très variable. L'antigène O est constitué par la répétition d'un motif de 3 à 6 sucres. On trouve une grande diversité de sucres dans les unités répétitives de l'antigène O, et ces sucres peuvent être substitués par des résidus de O-acétyle, phosphate, ou par des acides aminés. De plus, le nombre d'unités de répétitions est variable à l'intérieur d'une même souche. Ceci permet à la cellule de présenter de subtiles variations de ses sites de surface. Cette partie du LPS confère un pouvoir antigénique à la bactérie. Cette propriété, associée à la variabilité des structures antigéniques, a d'ailleurs été utilisée pour le typage des souches à l'intérieur d'une même espèce.

De plus, la membrane externe possède également de nombreux canaux qui permettent la diffusion passive de composés hydrophiles comme les sucres, les acides aminés, et certains ions de masse inférieure à 600-700 Daltons. Ces pores sont constitués de protéines justement appelées porines. D'autres protéines servent de transporteurs spécifiques pour des molécules trop grosses pour diffuser par les porines. La membrane externe n'est pas une structure séparée ; elle est reliée à la fois à la couche de muréine et à la membrane cytoplasmique. La connexion à la couche de muréine est réalisée par l'intermédiaire de deux types d'interaction, la plus importante mettant en jeu la lipoprotéine de la membrane externe. L'autre type d'interaction est l'association forte (mais probablement non covalente) de certaines porines avec la muréine.

3) Les glucanes périplasmiques osmorégulés

Des glucanes sont présents dans le périplasme de toutes les bactéries à Gram négatif (Schulman et Kennedy, 1979) en quantités variables dépendant de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries, d'où leur nom de glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Ces glucanes faisant l'objet de ce travail, ils seront décrits ultérieurement de façon plus complète.

4) Les exopolysaccharides composant la capsule

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire sécrétés par une grande variété de bactéries. Ils peuvent être associés à la paroi cellulaire et former la capsule ou bien être libérés dans le milieu extérieur sous la forme d'un mucus extracellulaire (Sutherland, 1988). Les EPS bactériens peuvent être des hétéropolysaccharides (constitués de plus d'un type de monosaccharide) ou des homopolysaccharides (constitués d'un seul type de monosaccharide). La synthèse de ce matériel est conditionnelle ; elle dépend du milieu de croissance et n'est pas essentielle à tout moment. La croissance peut très bien avoir lieu en l'absence de capsule, au moins dans les conditions du laboratoire. Pourtant, la capsule est souvent un déterminant majeur de la capacité de la cellule bactérienne à coloniser une niche particulière (Denny, 1995). De nombreuses études suggèrent que les EPS bactériens jouent un rôle important dans les interactions hôte-bactérie, qu'elles soient symbiotiques ou pathogènes. Par exemple, la capsule est une des principales lignes de défense contre la phagocytose, parce que les bactéries rendues glissantes échappent à l'absorption par les cellules phagocytaires.

5) L'enveloppe des bactéries acido-alcoolo-résistantes

Quelques types de bactéries à Gram positif, en particulier les bacilles de la tuberculose et de la lèpre, ont développé une autre solution au problème des attaques du milieu contre la membrane cytoplasmique. Il est admis que l'enveloppe de ces bactéries, à travers ses constituants majeurs, notamment des glycolipides, des lipopolysaccharides et des polysaccharides, joue un rôle essentiel dans l'immunopathologie de la tuberculose et dans la résistance à un grand nombre d'antibiotiques.

Le complexe peptidoglycane-mycoloyl-arabinogalactane est le constituant majeur de la paroi de ces bactéries, puisqu'il représente environ 35 % de son poids sec. Il s'agit d'un hétéropolysaccharide complexe composé de D-arabinose et de D-galactose exclusivement sous forme furanose, ancré à la paroi bactérienne *via* un pont phosphodiester à l'unité muramyle du peptidoglycane (McNeil et coll., 1990). Certaines unités de *Araf* sont estérifiées par les acides mycoliques qui sont des acides gras complexes α -ramifiés et β -hydroxylés (McNeil et coll., 1991). Ces bactéries synthétisent également le lipoarabinomannane (LAM) et le lipomannane (LM) qui sont les lipopolysaccharides majeurs de l'enveloppe. Le LAM est le constituant antigénique majeur et est constitué de *man* ρ et d'*araf* organisés autour d'un noyau mannane auquel se lie une chaîne arabinane latérale (Chatterjee et coll., 1991). Cette molécule est ancrée dans la membrane

par l'intermédiaire d'une unité phosphatidylinositol estérifiée. De plus, on trouve des glycolipides spécifiques d'espèces qui peuvent être classés en trois groupes : les glycolipides phénoliques, les lipo oligosaccharides à tréhalose, et les glycopeptidolipides (Puzo, 1993).

Tous ces composés particuliers constituant cette enveloppe protectrice rendent ces organismes presque imperméables à de nombreux produits corrosifs, en particulier les acides. Certaines mycobactéries virulentes ont même la capacité de se multiplier dans les phagosomes des macrophages. Cela a un prix : ces organismes ont une croissance très lente, sans doute parce que le taux d'absorption des nutriments est bas.

6) Les couches de surfaces cristallines

Une autre variation sur le thème de l'organisation de l'enveloppe est la présence, à la surface des bactéries et des archéons d'une structure cristalline. Cette structure consiste en une couche externe de sous-unités protéiques ou glycoprotéiques organisées de façon cristalline selon un système géométrique carré, hexagonal ou oblique (Beveridge et Graham, 1991). Cette structure, formant la partie la plus externe de la surface cellulaire, est appelée couche S. La couche S est présente chez un grand nombre d'espèces appartenant aux principaux groupes de bactéries et d'archéons. Cette structure est parfois constituée de plusieurs couches moléculaires empilées.

Une couche S est habituellement faite d'une seule sorte de protéine ou de glycoprotéine. Les molécules purifiées sont capables d'auto-assemblage, c'est-à-dire de former spontanément des structures identiques ou similaires à celles présentes à la surface des cellules.

Halobacterium halobium, qui fait partie du domaine des archéons, synthétise une S-glycoprotéine de 200 kDa qui contient 10 % de sucre. Les oligosaccharides contiennent approximativement 50 résidus de sulfate et des monosaccharides inhabituels : acide méthyl-galacturonique et du galactose sous forme furanose. Ces oligosaccharides sont liés à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison de type asparaginy-GalNAc (Paul et Wieland, 1987).

La présence de S-glycoprotéines chez les bactéries a été démontrée très récemment, montrant que la glycosylation des protéines de surface était possible chez ces organismes. Par exemple, la S-glycoprotéine de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* possède un glycane composé de résidus de rhamnose et de méthyl-rhamnose (approximativement 35 résidus par molécule) lié à la protéine par l'intermédiaire d'une liaison de type galactose-tyrosine (Bock et coll., 1994). De plus, le fait que le dolichol soit l'intermédiaire lipidique de synthèse des

glycoprotéines de surface bactérienne, comme celui des cellules eucaryotes, semble indiquer que ce composé est l'intermédiaire universel de synthèse des glycoprotéines (Hartman et coll., 1993).

La fonction de la couche S n'est pas encore comprise. Toutefois elle serait impliquée dans l'adhérence de la bactérie à des tissus spécifiques, ou jouerait un rôle protecteur pour la cellule dans un environnement hostile.

7) Les acides teichoïques

Chez les bactéries à Gram positif, l'épaisse couche multimoléculaire de muréine est associée à d'autres polymères dispersés, en particulier des acides teichoïques. Les acides teichoïques sont des polymères de glycérol ou de ribitol, réunis par des liaisons phosphodiester et portant un ou plusieurs substituants constitués d'acides aminés ou de sucres.

Les acides teichoïques peuvent représenter jusqu'à la moitié de la masse de la paroi chez certaines espèces. Ces composés, hautement antigéniques, peuvent varier selon la nature de leur squelette glucidique, la nature et la position de leurs nombreux substituants. Ces molécules sont utiles comme marqueurs taxonomiques car chaque espèce bactérienne en produit un type donné. La fonction de ces composés est encore l'objet de nombreuses spéculations. Toutefois, certains d'entre eux possèdent des substituants lipidiques (tels les acides lipotéichoïques) et ces composés pourraient servir à l'ancrage de la paroi dans la membrane sous-jacente. De plus ces composés, en association avec des protéines, pourraient faciliter l'attachement des bactéries aux cellules animales.

La paroi multicouche des bactéries à Gram positif empêche le passage des composés hydrophobes, car les sucres aminés et les acides aminés chargés de la muréine, ainsi que les acides téichoïques rendent la paroi très polaire. Ainsi, les cellules sont entourées d'une large couche hydrophile. Par conséquent, les cellules à Gram positif peuvent souvent résister à des composés hydrophobes toxiques, tels que les sels biliaries présents dans l'intestin des vertébrés.

II) Implications de l'enveloppe dans les interactions bactérie-plante

Les structures de l'enveloppe sont des éléments spécialisés permettant aux bactéries d'interagir avec d'autres types cellulaires. En effet, si l'eau, le sol et les aliments sont des habitats naturels des bactéries, il arrive qu'au cours de leur cycle de vie, elles interagissent avec des hôtes vivants qui leur offrent des conditions de vie favorable : c'est la symbiose. Du point de vue étymologique, le terme symbiose signifie « vie avec ». Au sens large, le concept de symbiose concerne toutes les formes de relations inter-spécifiques depuis l'union réciproquement profitable jusqu'à l'antagonisme parasitaire (Long et Staskawicz, 1993). La symbiose englobe souvent trois catégories définies selon les avantages que tirent les partenaires de leur coexistence :

- le parasitisme : dans une telle association, une espèce, le parasite, vit au dépens d'une autre, l'hôte, auquel il porte un préjudice de gravité variable ;

- le commensalisme : cette relation se caractérise par le fait qu'elle profite à l'une des espèces, sans que l'autre en paraisse avantagée ou désavantagée. L'hôte semble ne retirer aucun bénéfice ni ne subir aucun inconvénient de cette association ;

- le mutualisme : ce terme est réservé aux cas où les espèces concernées tirent bénéfice de leur relation. Parfois, ce sont de simples relations de voisinage grâce auxquelles les deux partenaires concernés bénéficient de leurs activités réciproques. On parle alors de symbiose « lâche » ou d'association symbiotique. Mais dans d'autres cas se créent d'intimes relations mutuellement avantageuses, capables selon l'importance des échanges de faciliter le développement des deux associés, voire même de conditionner la vie de l'un des partenaires ; c'est la symbiose « étroite ».

A) Quelques exemples d'interaction avec des plantes

1) La phytopathogénèse bactérienne

Les bactéries phytopathogènes (de nombreuses espèces de *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, et *Erwinia*, qui sont toutes des bactéries à Gram négatif) sont des parasites facultatifs car elles sont capables de se développer dans le sol ou sur les feuilles. Elles n'ont pas développé de moyens

spécifiques pour pénétrer dans leurs hôtes et elles pénètrent par des ouvertures naturelles, comme les stomates ou les blessures. La progression de l'invasion dépend de la reconnaissance par l'hôte du pathogène. La maladie a lieu quand l'hôte est incapable de reconnaître ce dernier et donc d'induire une réaction de défense.

Les interactions des bactéries phytopathogènes avec leurs hôtes potentiels peuvent se diviser en deux catégories :

- La réaction de pathogénicité a lieu quand un pathogène donné attaque une espèce hôte susceptible. C'est une réaction de compatibilité entre un pathogène virulent et un hôte sensible. Le pathogène évite alors les mécanismes de surveillance de la plante ; il peut se disséminer dans les espaces intercellulaires et développer les symptômes de la maladie. Les symptômes peuvent prendre diverses formes, telles que tâches brunes, lésions nécrotiques, pustules, ou flétrissures.

- La réaction de résistance ou d'hypersensibilité a lieu quand le pathogène envahit une plante non hôte ou un cultivar résistant d'une plante hôte. C'est une réaction d'incompatibilité entre un pathogène virulent et un hôte résistant. Cette réaction nécessite une reconnaissance précoce du pathogène par la plante, qui permet à celle-ci d'exprimer tout un ensemble de gènes de défense qui engendrent une nécrose des tissus. Cette défense aboutit à « contenir » et à tuer le pathogène.

2) La phytopathogénèse d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les organismes du genre *Agrobacterium*, membres de la famille des *Rhizobiaceae*, provoquent la formation de tumeurs sur les plantes dicotylédones. *A. tumefaciens* induit l'apparition de la galle du collet (« crown gall ») sur les tiges des plantes. Il s'agit d'une prolifération désorganisée des cellules de la plante, sur des sites de blessures antérieures.

L'infection est le résultat du transfert et de l'intégration d'une partie du plasmide Ti inducteur de tumeurs dans l'ADN de la plante. Des gènes présents sur l'ADN transféré s'expriment dans les cellules transformées de la plante. La production d'une opine, composé qui n'a apparemment pas de fonction dans la plante, servira comme source de nutriments pour *A. tumefaciens*. Le plasmide Ti contient également des gènes non transférés qui codent des protéines responsables du transfert du T-ADN, et qui dirigent le catabolisme de l'opine. Le plasmide Ti constitue donc une unité complexe qui crée une niche métabolique unique.

3) La symbiose des *Rhizobium*

Toutes les bactéries du genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* sont capables d'organiser une réaction de symbiose « étroite » avec une plante hôte. Presque toutes les plantes hôtes font partie de la famille des Légumineuses. Les deux organismes se différencient pour bénéficier d'une collaboration métabolique : la bactérie transforme l'azote atmosphérique en ammoniac, la plante métabolise cet ammoniac en acide aminés, et en retour approvisionne la bactérie en sucres. Cette alliance se traduit par la formation de nodules le plus souvent racinaires. La symbiose est spécifique. Ainsi *R. meliloti* n'infecte que la luzerne, alors que le pois, le soja ou le haricot sont infectés et nodulés respectivement par *R. léguminosarum* biovar *viciae*, *B. japonicum* et *R. phaseoli*. Toutefois, certaines bactéries, comme *Rhizobium* NGR234, bactérie isolée d'une Légumineuse de Nouvelle-Guinée, peuvent infecter plus de 60 espèces de la famille des Légumineuses. Ce sont les racines des Légumineuses qui synthétisent les composés phénoliques ou flavonoïdes inducteurs du processus de symbiose. Ces composés activent les gènes *nod* (pour nodulation). La bactérie synthétise et sécrète alors des lipo-oligosaccharides, les facteurs Nod, qui sont responsables de l'organogenèse nodulaire chez la plante.

Les étapes de la symbiose sont :

- L'attraction : les bactéries vivant dans le sol à l'état libre sont attirées vers les racines des Légumineuses par chimiotactisme. La plante sécrète des attractifs à cet effet.
- La reconnaissance et la fixation : une reconnaissance spécifique a lieu entre la plante hôte et la bactérie ; elle pourrait faire intervenir des lectines de la plante hôte et des composés de l'enveloppe des *Rhizobium*. Les *Rhizobium* infectieux se fixent sur les minces poils absorbants faisant saillie sur des cellules épidermiques spécialisées de la plante hôte. Cet attachement induit une courbure des poils absorbants en forme de crosse de berger.
- La formation du cordon d'infection : la plante forme une structure tubulaire appelée cordon d'infection. Les *Rhizobium* se disposent en file dans le cordon d'infection.
- La formation du nodule : les bactéries en croissance stimulent la division des cellules corticales sous-jacentes qui forment une grosse nodosité de surface.
- La pénétration et la différenciation : le cordon d'infection grandit, se ramifie et traverse les cellules corticales en division. Les *Rhizobium* sont relâchés depuis le cordon d'infection jusque dans le cytoplasme des cellules méristématiques de la plante. Chaque nodosité mature contient environ la moitié de son poids en bactéries intracellulaires, qui ont perdu en grande partie leur propre paroi cellulaire. La membrane cytoplasmique de chaque bactérie est entourée par une autre

membrane dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte dénommée membrane pér bactéroi d ienne. Ce sont ces bactéries modifiées, appelées bactéroi des, qui fixent l'azote atmosphérique qui sera finalement utilisé par le végétal.

B) Les composants glucidiques de l'enveloppe comme facteurs d'interaction

Nous avons vu précédemment que de nombreux types d'interactions bactérie-plante hôte existent, aboutissant à des résultats différents, aussi bien bénéfiques que défavorables pour l'hôte. De la part des micro-organismes, de multiples fonctions sont nécessaires à l'établissement de cette interaction. Cette interaction débute par la reconnaissance et l'attachement du parasite à la surface de la cellule eucaryote. C'est l'étape préliminaire obligatoire de tout processus d'infection ou de symbiose. Elle fait logiquement intervenir les composants de surface des deux partenaires. Il semble que les polysaccharides de surface ne représentent pas qu'un simple manteau de protection passif, mais qu'ils servent de signaux de reconnaissance vis-à-vis de la plante (Long et Staskawicz, 1993).

1) Le rôle des exopolysaccharides

La présence d'EPS à la surface de la cellule est souvent indispensable pour la mise en place d'une relation bactérie-plante hôte. La capsule polysaccharidique semble intervenir lors du contact de cellule à cellule ; elle interagit avec des composants de surface de la cellule hôte (lectines, intégrines). De plus, elle aide à l'adhérence du parasite sur la cellule hôte.

a) Le rôle des EPS dans la symbiose étroite

Chez beaucoup de *Rhizobium*, la synthèse d'EPS est nécessaire à la colonisation du nodule. Les mutants de *Rhizobium meliloti* qui ne synthétisent pas l'EPS majeur, connu sous le nom de succinoglycane, induisent la formation chez la luzerne de nodules inefficaces dans la fixation de l'azote car vides de bactéroi des (Leigh et coll., 1985). Cet EPS est un hétéropolymère acide constitué de glucose, galactose, pyruvate, succinate et acétate dans les rapports 7 : 1 : 1 : 1 : 1 (Reinhold et coll., 1994 ; figure 4).

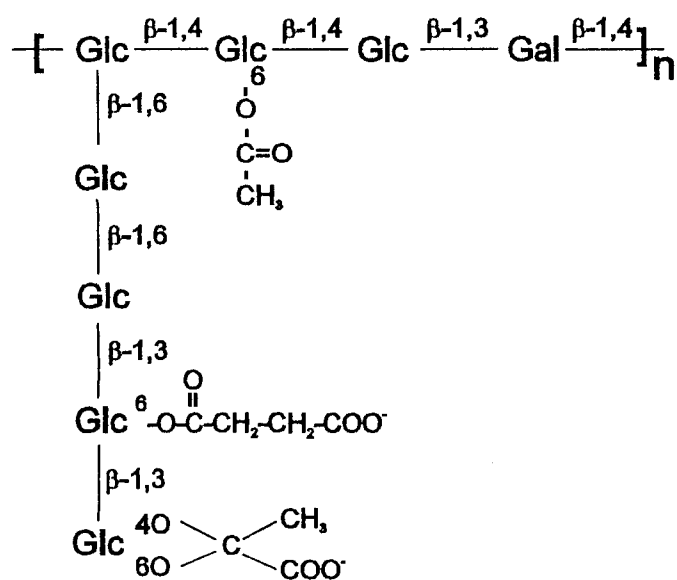


Figure 4 : représentation schématique de l'unité de répétition du succinoglycane produit par *R. meliloti* (Reinhold et coll., 1994).

Pour synthétiser cette molécule complexe, de nombreux gènes *exo* (Reuber et Walker, 1993a) sont nécessaires. Ils peuvent être localisés aussi bien sur l'un des deux plasmides de symbiose et sur le chromosome. Les mutants défectueux pour le gène responsable de la succinylation du polysaccharide ne forment pas de nodules efficaces (Leigh et coll., 1987), alors que l'absence des substituants acétate ne modifie en rien les capacités de symbiose (Reuber et Walker, 1993b). De plus, des mutants des gènes régulateurs de la biosynthèse de l'EPS, formant ces EPS en plus ou moins grande quantité que la normale, ont des propriétés de colonisation du nodule plus ou moins altérées. Il semble que ce soit jusqu'au moment précis de l'invasion des nodules que la présence d'un succinoglycane en quantité normale soit indispensable autour de la bactérie. Plus tard, une fois les bactéries arrivées à l'intérieur du nodule, on note un arrêt de l'expression des gènes *exo* impliqués dans la biosynthèse du succinoglycane (Reuber et coll., 1991).

b) Le rôle des EPS dans le pouvoir phytopathogène

Chez beaucoup de bactéries phytopathogènes capables de synthétiser des EPS, il y a une corrélation entre la synthèse de ces composés et la virulence. La perte de synthèse des EPS est souvent liée à une perte ou à une réduction de la virulence. Quelques EPS ont un rôle non spécifique sur la virulence. En effet, ils peuvent entraîner un flétrissement en dérangeant l'apport d'eau et de nutriments solubles aux cellules de la plante car ils rendent visqueux tout fluide, et donc diminuent le flux vasculaire. Les EPS peuvent également permettre la suppression des réactions de défense de la plante en réduisant le contact avec les molécules toxiques. De plus, ces molécules peuvent créer un micro environnement favorable en protégeant la bactérie de la dessiccation et en concentrant les minéraux et les nutriments (Sutherland, 1988 ; Denny, 1995). Toutefois, et de l'aveu même des auteurs, le rôle des EPS dans la virulence est sujet à de nombreuses spéculations et beaucoup de chemin reste à faire.

Burkholderia solanacearum synthétise un EPS contenant trois sucres aminés : le N-acétyl-D-galactosamine, l'acide 2-N-acétyl-2-deoxy-L-galacturonique (GalNAcA), et le 2-N-acétyl-4-N-(3-hydroxybutanoyl)-2,4,6-trideoxy-D-glucose (BacNAc4N[3OHBut]) dans les rapports 1 : 1 : 1 (Orgambide et coll., 1991 ; figure 5). Ce polysaccharide induit seul le flétrissement sur des coupes de tiges de plants de tomate et des mutants déficients dans la synthèse des EPS montrent clairement des symptômes de virulence grandement réduits.

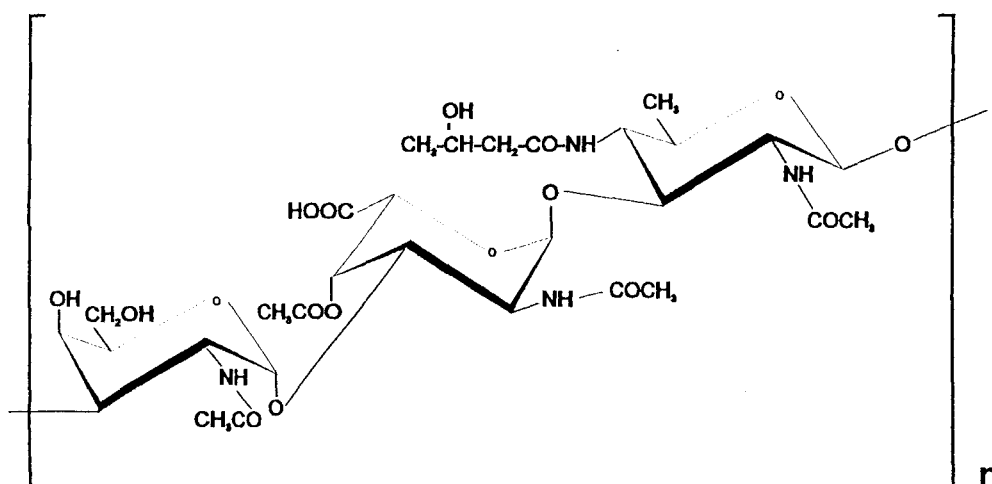


Figure 5 : représentation schématique de l'unité de répétition de l'EPS majeur produit par *B. solanacearum* (Orgambide et coll., 1991).

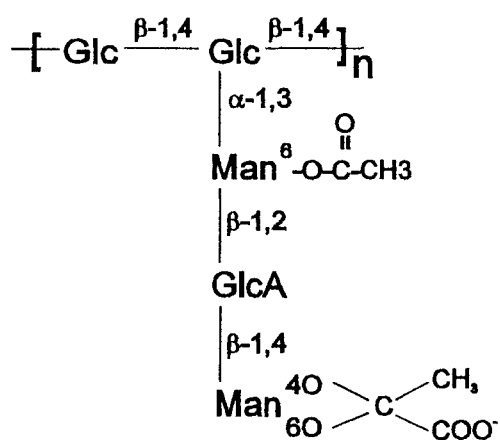


Figure 6 : représentation schématique de l'unité de répétition du xanthane synthétisé par *X. campestris* (Jansson et coll., 1975)

Tous les pathovars de *X. campestris* synthétisent des EPS, connus sous le nom de xanthanes, qui possèdent un squelette cellulosique sur lequel vient se greffer un trisaccharide constitué de Man : GlcA : acétate : pyruvate dans les rapports molaires 2 : 1 : 1 : 1 (Jansson et coll., 1975 ; figure 6). Ce polymère possède une conformation en bâtonnet (Sutherland, 1988). La composition de cet EPS est variable à cause des taux d'acétate et de pyruvate qui ne sont pas constants d'une souche à l'autre. Ce polysaccharide remplit les vaisseaux du xylème des feuilles après l'infection, ce qui provoque le premier symptôme visible de la maladie : le « noircissement des veines ».

2) Le rôle du lipopolysaccharide

a) Le rôle du LPS dans la symbiose

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* produit deux sortes de LPS qui se différencient par leur mobilité électrophorétique. Il existe une forme légère (II) ne possédant certainement que le noyau oligosaccharidique substituant le lipide A et une forme lourde (I) qui doit posséder en plus un antigène O hétérogène variant d'une souche à l'autre. Les mutants ne possédant pas la forme lourde du LPS forment des cordons d'infection et induisent la courbure racinaire, mais forment des nodules vides de bactéroïdes (De Maagd et coll., 1989). En effet, ces bactéries mutantes ne possédant pas d'antigène O sur leur LPS ne sont pas relâchées dans la cellule hôte depuis le cordon d'infection ; elles sont dégradées dans celui-ci.

La composition et le taux de LPS varient au cours de la différenciation. On trouve du LPS formes I et II en quantité égale dans les bactéries à l'état libre. Au contraire, dans les bactéroïdes différenciés, on ne trouve plus de LPS I (portant l'antigène O) et qu'une faible quantité de LPS II. Cette disparition d'une bonne partie du LPS est brutale. Elle a lieu au cours de la pénétration des bactéries et doit donc faire intervenir une dégradation ou une modification du LPS (Goosen-de Roo et coll., 1991). L'hypothèse émise est que le LPS contribue à maintenir une certaine charge de surface lors du contact entre la membrane péribactéroïdienne et celle de la bactérie lors du processus de la pénétration ; c'est pourquoi on peut conclure que le LPS est sans nul doute un facteur essentiel de symbiose (De Maagd et coll., 1989).

b) Le rôle du LPS dans la pathogénicité

Kingley et coll. (1993) ont montré qu'un mutant de *X. campestris* pv. *citrumelo* qui synthétise un LPS altéré et 75 % moins d'EPS que la souche sauvage, meurt moins de 5 jours après l'inoculation dans les feuilles de citronnier. Ce même mutant se multiplie normalement et est

pathogène chez le haricot, un hôte alternatif, ce qui montre que ces polysaccharides ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans la pathogénicité, mais qu'ils protègent le pathogène de l'environnement inhospitalier que représente la feuille de citronnier.

Un mutant de *X. campestris* pv. *campestris* qui synthétise un LPS sans antigène O ne croît que lentement dans les tissus des plantes (Newman et coll., 1994). Il semble que ces polysaccharides masquent la présence des bactéries dans les espaces intercellulaires.

Toutefois, très peu de données sont actuellement disponibles concernant le rôle des LPS dans la pathogénicité chez les plantes. Il est toutefois évident que toute altération de ces composés peut entraîner une modification de la composition, de la structure et de l'intégrité de la membrane externe, et donc affecter la pathogénicité des bactéries de façon imprévisible.

III) Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)

Comme nous l'avons vu précédemment, les polysaccharides de surface semblent jouer un rôle important dans les interactions bactérie-hôte. Si de nombreuses revues bibliographiques sur le rôle des polysaccharides de surface existent, les OPG, autres constituants glucidiques de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif ont retenu comparativement moins l'attention.

Des glucanes sont présents dans le périplasma de toutes les bactéries à Gram négatif en quantités variables dépendant de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries. Ces glucanes sont donc dénommés glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Cette conservation dans des bactéries très différentes, malgré le coût énergétique élevé de leur synthèse, permet de penser que ceux-ci ont un rôle essentiel dans les cellules à Gram négatif.

La concentration cellulaire des OPG peut varier de 0,5 % à 20 % du poids sec des bactéries, et ce niveau varie grandement en fonction des espèces, de la composition du milieu de culture et de l'état physiologique des bactéries. Les OPG peuvent être linéaires et branchés, ou cycliques, et ils sont hétérogènes en taille. Ils sont toujours liés par l'intermédiaire de liaisons glycosidiques en β . Si le glucose est le seul monosaccharide présent, ces composés peuvent être substitués par des molécules d'origines et de compositions diverses, tels que par exemple des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol provenant des phospholipides membranaires.

Ce chapitre va résumer les connaissances actuelles et tenter de montrer que l'intérêt grandissant pour ces molécules est justifié.

A) Les OPG d'*Escherichia coli*

1) La découverte et la structure des OPG d'*E. coli*

L'existence d'OPG chez *E. coli* a été découverte par van Golde et coll. (1973) lors de leur étude sur le renouvellement des têtes polaires des phospholipides. Les auteurs avaient remarqué un transfert de radioactivité, initialement contenue dans la fraction lipidique, vers la phase aqueuse. C'est ainsi qu'il a été démontré, qu'au cours de la croissance des bactéries, une partie importante des résidus de phosphoglycérol est transférée sur un oligosaccharide, alors baptisé MDO (pour « Membrane-Derived Oligosaccharides ») en raison de son lien avec les phospholipides.

Ces molécules sont localisées dans le périplasme (Schulman et Kennedy, 1979) et constituent une famille de glucanes, possédant 6 à 12 résidus de glucose par molécule (Schneider et coll., 1979 ; Kennedy, 1987). Ces molécules hautement branchées s'organisent autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2, sur laquelle viennent se greffer des résidus de glucose liés en β -1,6 (Schneider et coll., 1979 ; figure 7).

2) Les substituants du MDO

Le MDO est fortement substitué par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol et de phosphoéthanolamine attachés par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester sur le carbone-6 d'un des résidus de glucose (Kennedy et coll., 1976 ; figure 7). Ces substituants proviennent des têtes polaires des phospholipides membranaires, respectivement des phosphatidylglycérols et des phosphatidyléthanolamines (Jackson et Kennedy, 1983 ; Miller et Kennedy, 1987). Le MDO est également substitué par des résidus de succinate (van Golde et coll., 1973), dont l'origine et le point d'attachement sur le squelette glucidique sont encore inconnus.

3) La biosynthèse du MDO est osmorégulée

La biosynthèse des OPG synthétisés par *E. coli* est osmorégulée (Kennedy, 1982). Plus l'osmolarité du milieu de culture est grande, plus la quantité d'OPG synthétisés est faible. Le MDO représente 0,5 % à 1 % du poids sec de la bactérie, dans les milieux de croissance standards de laboratoire (300 à 400 mosM ; van Golde et coll., 1973). Toutefois, lors de la croissance dans un milieu de très basse osmolarité (20-70 mosM), ils peuvent représenter jusqu'à 5 % du poids sec des bactéries (Kennedy, 1982). De plus, l'activité de synthèse du MDO semble soumise à un contrôle en retour qui dépend de la quantité de MDO dans le périplasme (Lacroix, 1989 ; Rumley et coll., 1992). Les différents mécanismes de substitution, quant à eux, ne semblent soumis à aucune régulation (Bohin et Kennedy, 1984b).

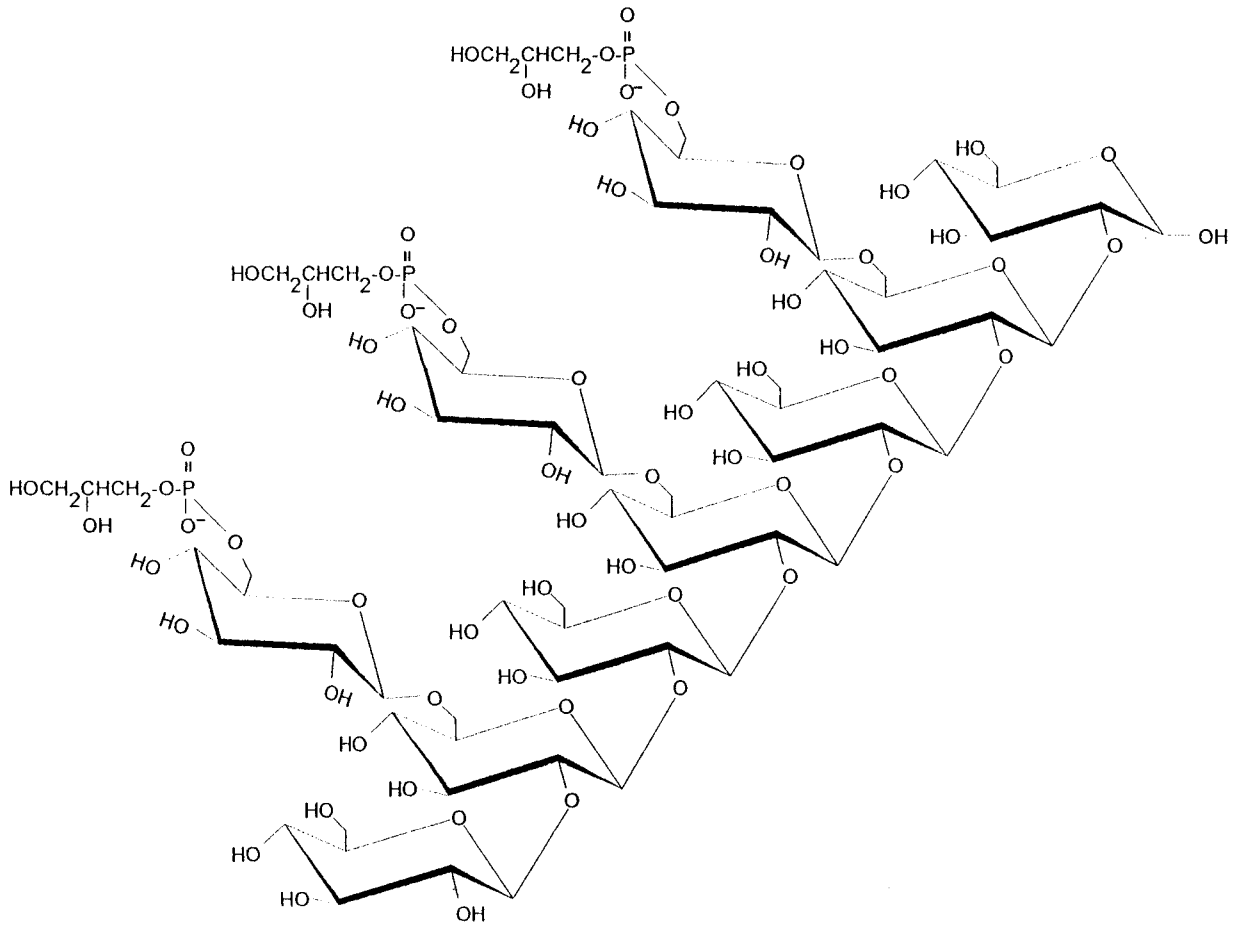


Figure 7 : représentation schématique d'une des sous-fractions du MDO (Kennedy, 1987).

4) La biosynthèse du MDO

a) Biosynthèse *in vivo* : un modèle de travail

Les connaissances déjà acquises sur la biosynthèse d'autres polysaccharides bactériens ont permis d'élaborer un modèle pour la biosynthèse (figure 8) du MDO (Goldberg et coll., 1981 ; Bohin et Kennedy, 1984b ; Kennedy, 1987).

L'élongation et le système glucosyltransférase

Afin de préciser le déroulement de la biosynthèse du MDO, un système pouvant servir de modèle pour cette biosynthèse, permettant de réaliser *in vitro* l'élongation β -1,2 de chaînes glucosidiques, a été élaboré par Weissborn et Kennedy (1984). Ce système glucosyltransférase nécessite pour l'élongation une fraction membranaire non purifiée, de l'Acyl Carrier Protein (ACP), de l'UDP-glucose, des β -D-glucosides amphiphiles, et des ions magnésium.

L'ACP, connue jusqu'alors pour son rôle dans la biosynthèse des acides gras, est une petite protéine thermorésistante de 77 acides aminés, portant un groupement phosphopanthétéine. Ce dernier, indispensable pour l'activité de l'ACP lors de la biosynthèse des acides gras, n'est pas nécessaire pour l'activité de cette dernière dans la biosynthèse du MDO (Thérisod et coll., 1986 ; Thérisod et Kennedy, 1987).

Les β -D-glucosides servent d'amorce à la réaction d'élongation. C'est l'octyl β -D-glucoside qui est le plus efficace de tous ceux testés.

Les produits formés *in vitro* par le système glucosyltransférase sont des polymères de glucoses linéaires liés en β -1,2. L'analyse des produits formés par chromatographie de tamisage moléculaire montre que la majorité des molécules formées possède une taille compatible avec celles des molécules de MDO produites *in vivo* (approximativement 10 résidus de glucose par molécule), mais certaines sont d'une taille plus élevée (Weissborn et Kennedy, 1984).

In vivo, l'élongation de la molécule de MDO s'effectue sur la face interne de la membrane cytoplasmique, l'UDP-glucose étant absent de l'espace périplasmique.

Les activités du système glucosyltransférase sont réduites par la présence d'osmolytes ioniques (NaCl, KCl), mais pas par la présence d'osmolytes neutres (glucose, mannitol) (Rumley et coll., 1992), contrairement à la régulation *in vivo*.

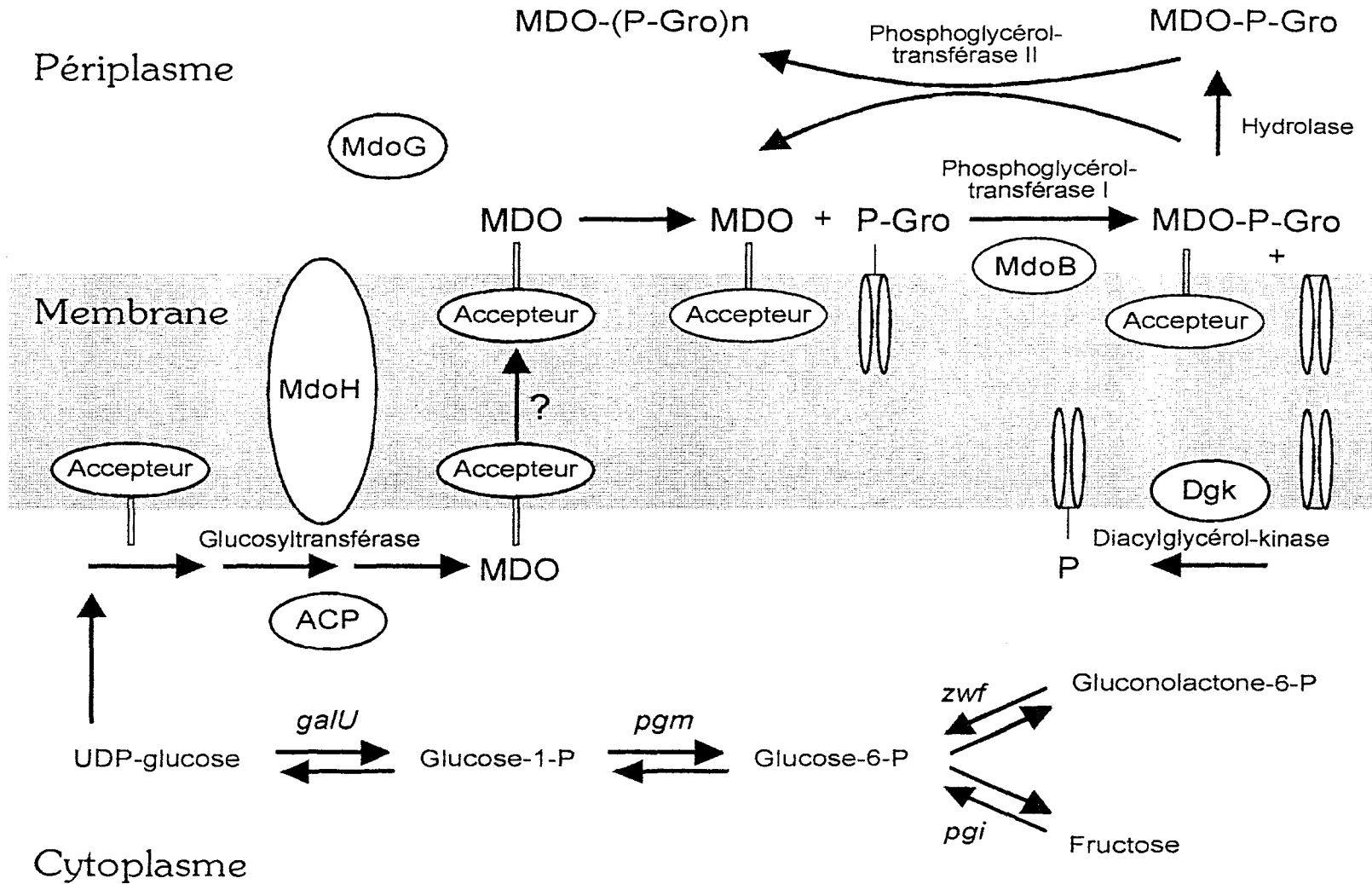


Figure 8 : la biosynthèse des OPG chez *E. coli* (un modèle de travail).

La molécule précurseur et initiation de la biosynthèse

La molécule précurseur du MDO est l'UDP-glucose (Schulman et Kennedy, 1977). L'initiation de la biosynthèse du MDO se ferait sur un accepteur membranaire d'origine et de nature encore inconnues. Weissborn et coll. (1991) ont montré que le système *in vitro* d'élongation de chaînes de polyglucose, ou système glucosyltransférase est inhibé par la présence de bacitracine ou d'amphotricine. Ces deux antibiotiques complexant les dérivés de polyprénylphosphate, il semble qu'un dérivé pré-nol soit nécessaire au fonctionnement du système glucosyltransférase.

Toutefois, Harkness et coll. (1990) ont montré que la synthèse *in vivo* était insensible à l'action de la colicine M. Ce résultat montre que le bactoprénol ne sert pas d'accepteur à la biosynthèse du MDO *in vivo*. L'hypothèse du bactoprénol comme accepteur pour la biosynthèse du MDO avait été émise (Kennedy, 1987) par analogie avec le déroulement des biosynthèses des glycanes de l'enveloppe chez *E. coli* (peptidoglycane et antigène O du LPS), qui eux sont inhibés par la colicine M (Harkness et Braun, 1989a et b).

Les processus de ramification et de transfert

Le processus de ramification n'est pas connu. S'agit-il d'un ajout de nouveaux résidus de glucose (provenant de l'UDP-glucose) sur le squelette linéaire, ou d'un réarrangement des chaînes linéaires préexistantes ?

Dans le premier cas, la ramification ne pourrait avoir lieu que du côté cytoplasmique, car l'UDP-glucose n'est présent que dans le cytoplasme des bactéries. Dans le second cas, la ramification pourrait avoir lieu du côté périplasmique, après transfert de la molécule naissante de l'autre côté de la membrane interne.

Le processus permettant le passage des molécules de MDO naissantes à travers la membrane interne vers le périplasme est inconnu.

Les processus de substitution

Du côté périplasmique de la membrane interne, le MDO ramifié est substitué par la phosphoglycérol-transférase I. Cette enzyme, dénommée MdoB, associée à la membrane interne transférerait les résidus de *sn*-1-phosphoglycérol sur les molécules de MDO encore non substituées (Jackson et Kennedy, 1983 ; Bohin et Kennedy, 1984b). Les mutants *mdoB* produisent un MDO dépourvu de résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, mais substitué par une

quantité environ deux fois plus importante de résidus de phosphoéthanolamine, par rapport à celui d'une souche sauvage (Fiedler et Rotering, 1985 ; Miller et Kennedy, 1987). Au contraire, la quantité de résidus de succinate est inchangée. Les mutants *mdoB* ne présentent pas par ailleurs de phénotype de croissance marqué. Le clonage moléculaire du locus *mdoB* a été réalisé récemment au laboratoire (Lanfroy et Bohin, 1993)

La substitution secondaire des molécules de MDO est réalisée par une enzyme périplasmique, la phosphoglycérol-transférase II (Goldberg et coll., 1981). Cette enzyme soluble n'a aucune activité détectable avec le phosphatidylglycérol comme substrat donneur. La phosphoglycérol-transférase II transférerait donc des résidus de phosphoglycérol d'une molécule de MDO à une autre. Actuellement, on ne connaît pas les mécanismes qui gouvernent les substitutions par les résidus de phosphoéthanolamine et de succinate.

b) Le locus chromosomique *mdoGH* est responsable de la biosynthèse des OPG chez *E. coli*

La découverte d'un mutant déficient dans la synthèse du MDO porteur d'une altération d'origine inconnue, a permis à Bohin et Kennedy (1984a) d'initier la génétique du système de biosynthèse des OPG d'*E. coli*. Chez ce mutant, dénommé *mdoAI*, la fraction membranaire est inactive dans le système glucosyltransférase *in vitro* (Weissborn et Kennedy, 1984).

Le clonage moléculaire du locus *mdoGH* a été réalisé par Lacroix et coll. (1989). L'analyse des ARNm transcrits au locus *mdoGH* montre que leur abondance dépend de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries (Lacroix et coll., 1991). Une souche portant le plasmide *Mdo*⁺ synthétise environ 7 fois plus d'ARNm à basse osmolarité (70 mosM) qu'à haute osmolarité (670 mosM), ce qui indique qu'au moins une partie de la régulation osmotique a lieu à un niveau transcriptionnel. Les deux gènes formant ce locus sont tous les deux nécessaires à la synthèse des OPG. Le gène *mdoG* code une protéine périplasmique de 56 kDa. Les mutants *mdoG* sont actifs dans le système glucosyltransférase *in vitro*. La protéine MdoG interviendrait dans une étape non encore définie. Le gène *mdoH* code une protéine de 97 kDa transmembranaire de la membrane interne qui fait partie du système glucosyltransférase (Loubens et coll., 1993a). L'obtention de plusieurs protéines de fusion entre MdoH et la bêta-lactamase a permis l'étude de la topographie de MdoH (Debarbieux, 1995). L'extrémité aminée, ainsi qu'un large domaine central et l'extrémité carboxylique sont cytoplasmiques. Ces trois régions sont séparées par 8 segments transmembranaires, dont 6 séparent l'extrémité aminée du domaine central de l'extrémité carboxylique. Ces huit segments transmembranaires pourraient former un canal à travers la

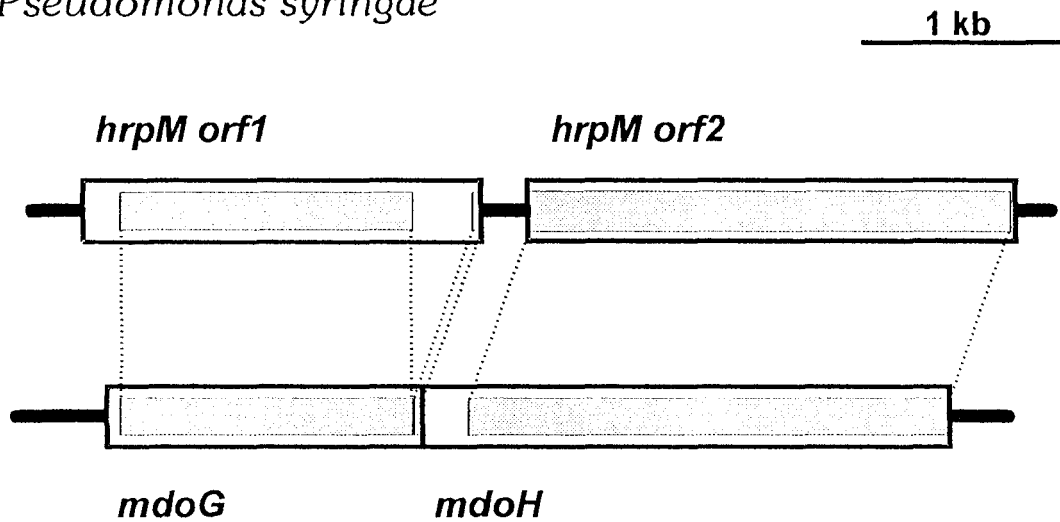
membrane interne nécessaire à la translocation de la chaîne glucosidique du cytoplasme vers le périplasme.

c) Le locus *mdoGH* est conservé chez *P. syringae* pv. *syringae*

Loubens et coll. (1993a) après avoir établi la séquence nucléotidique de l'opéron *mdoGH*, n'ont observé aucune homologie avec les gènes gouvernant la biosynthèse des OPG des *Rhizobiaceae* (voir ci-dessous). Par contre, une très forte homologie (figure 9) avec le locus chromosomique *hrpM* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Mukhopadhyay et coll., 1988) fut montrée (69 % d'identité avec la séquence nucléotidique ; 79 % d'homologie pour la séquence en acides aminés). C'est en isolant des gènes du système *hrp* (*hrp* pour « hypersensitive reaction and pathogenicity » ; Willis et coll., 1991) chez *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, qui est une bactérie à Gram négatif phytopathogène du haricot, que fut obtenue la souche *hrpM* non virulente. Cette souche ne provoque aucun flétrissement chez la plante hôte, ni de réponse hypersensitive chez les plantes non-hôtes, contrairement à la souche sauvage (Mills et Niepold, 1987). Le séquençage nucléotidique du locus *hrpM* a été réalisé par Mukhopadhyay et coll. (1988). Il révèle deux phases de lecture ouvertes organisées en opéron. L'étude génétique de l'opéron a montré que des insertions dans l'une ou l'autre des phases de lecture ouvertes de l'opéron provoquent un phénotype mutant *Hrp*⁻. Les mutants *Hrp*⁻ sont incapables de se développer *in planta* et forment, de plus, des colonies muqueuses sur milieu gélosé. Le produit codé par la première phase de lecture ouverte est une protéine plutôt hydrophile. La protéine *HrpM*, codée par la deuxième phase de lecture ouverte (*hrpm orf2*), est une protéine très hydrophobe, et pourrait être une protéine membranaire. Le rôle des produits des gènes de l'opéron *hrpM* était inconnu. Ces produits ne sont pas nécessaires à la croissance des bactéries dans un milieu minimal, mais sont nécessaires pour la croissance des bactéries *in planta* (Mills et Mukhopadhyay, 1990).

Cette très grande homologie pouvait suggérer que les opérons *mdoGH* et *hrpM* ont des fonctions homologues chez les deux organismes. Cela a été vérifié en introduisant dans une souche *mdoH* un plasmide portant le gène *hrpM* (*orf2*) de *P. syringae* sous le contrôle d'un promoteur d'*E. coli*. (Loubens et coll., 1993b). On observe alors chez *E. coli* une synthèse d'OPG indiquant la complémentation fonctionnelle entre ces deux gènes. *HrpM* est donc la glucosyltransférase responsable de la biosynthèse des OPG chez *P. syringae*.

Pseudomonas syringae



Escherichia coli

Figure 9 : structure génétique des régions homologues d'*E. coli* et de *P. syringae* (Loubens et coll., 1993a).

Les rectangles grisés représentent les séquences homologues. Les lignes noires représentent les régions extragéniques.

B) Les OPG des *Rhizobiaceae*

La famille des *Rhizobiaceae* synthétise des glucanes cycliques liés par l'intermédiaire de liaisons glycosidiques en β . Les premières études sur ces composés ont été effectuées sur les glucanes présents dans le milieu de culture. C'est pourquoi la localisation cellulaire de ces composés a été tout d'abord occultée. C'est Zevenhuizen et Scholten-Koerselman (1979) qui démontrèrent les premiers qu'un haut niveau de glucanes est associé à la cellule bactérienne. La localisation cellulaire des OPG synthétisés par *R. meliloti*, *A. tumefaciens*, et *Bradyrhizobium* spp., a été précisée après différents traitements qui touchent préférentiellement la membrane externe. Ces études ont révélé que les OPG synthétisés par les *Rhizobiaceae* sont localisés dans le périplasme des bactéries. (Abbe et coll., 1982 ; Miller et coll., 1986 ; Miller et Gore, 1992). Actuellement, on ne sait pas si les OPG présents dans le milieu de culture des *Rhizobiaceae* sont la conséquence d'une lyse partielle des cellules ou d'une véritable excrétion. La synthèse des OPG synthétisés par les *Rhizobiaceae* est osmorégulée (Miller et coll., 1986 ; Dylan et coll., 1990 ; Miller et Gore, 1992), avec un niveau de régulation comparable à celui précédemment décrit pour *E. coli*. De plus, comme chez *E. coli*, l'activité de synthèse des OPG semble soumise à un contrôle en retour (Breedveld et coll., 1992).

1) Les structure des glucanes cycliques liés en β -1,2

Les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* synthétisent des glucanes liés en 1,2 (Baretto-Bergter, 1980). La nature cyclique et non branchée de ces composés a été proposée car ils ne présentent aucunes extrémités terminales réductrice et non-réductrices (York et coll., 1980). La confirmation du caractère cyclique, ainsi que l'anométrie β des liaisons, a été faite par des études de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (Dell et coll., 1983 ; Amemura et coll., 1983). Les glucanes cycliques liés en β -1,2 (figure 10) synthétisés par *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *A. tumefaciens* sont composés d'un mélange de glucanes de 17 à 26 résidus de glucose par molécule (Dell et coll., 1983 ; Koizumi et coll., 1983 ; Koizumi et coll., 1988 ; Hisamatsu, 1992 ; Garozzo et coll., 1994), tandis que des glucanes plus grands (jusqu'à un degré de polymérisation de 40) ont été détectés chez *R. meliloti* (Koizumi et coll., 1984 ; Benincasa et coll., 1987). *R. phaseolus* et *R. tropici* synthétisent majoritairement un glucane cyclique lié en β -1,2 possédant 17 résidus de glucose par molécule (Hisamatsu et coll., 1983 ; Serrano et coll., 1993). Ces résultats sont résumés dans le tableau 1. Williamson et coll. (1992) ont montré que la

distribution de taille de ces glucanes résulte d'une compétition entre les réactions d'élongation et de cyclisation que la glucosyltransférase effectue.

Il est à noter que des glucanes possédant un degré de polymérisation inférieur à 17 résidus de glucose n'ont jamais été trouvés chez les *Rhizobiaceae*, suggérant qu'il existe trop de contraintes pour que de telles molécules existent. Cette hypothèse a été étayée par York et coll. (1993), qui ont de plus montré par des simulations sur Metropolis Monte Carlo que l'énergie de cohésion de ces glucanes diminuait exponentiellement lorsque l'on augmentait la taille de 17 à 24 résidus de glucose par molécule. Le diamètre prédit des cavités relativement petites et plutôt polaires de ces molécules varie de 0,88 nm (DP 18) à 1,30 nm (DP 24). Une étude du composé possédant 17 résidus de glucose par molécule (Serrano et coll., 1993) par mécanique moléculaire a prédit une cavité plus importante de 1,4 nm, ainsi qu'une structure pseudo-symétrique. Toutefois, André et coll. (1995b) ont montré, en se basant sur l'étude par RMN du sophorose et sophotriose en solution (1995a), que le glucane cyclique lié en β -1,2 possédant 17 résidus de glucose par molécule adoptait un arrangement irrégulier et non-symétrique. Globalement, cette molécule s'enroule sur elle-même avec des résidus aussi bien vers l'intérieur que vers l'extérieur, ce qui réduit considérablement la taille de la cavité (le diamètre est d'environ 0,3 - 0,4 nm dans le cas le plus favorable). De plus, ces auteurs démontrent que la structure pseudo-symétrique décrite par Serrano et coll. (1993) pour ce glucane possède une énergie relative beaucoup plus élevée que celles des autres structures obtenues (André et coll., 1995b). Les spectres RMN ^1H et ^{13}C très simples de ces composés (7 ou 6 signaux correspondants aux spectres de l'unité glucopyranosyle de répétition) semblent indiquer que toutes les unités de glucose sont magnétiquement équivalentes, et donc que la structure est symétrique (Poppe et coll., 1993). Toutefois, il est plus logique de penser que la nature de ces spectres s'explique par des équilibres, très rapides face à l'échelle de temps de la RMN, entre plusieurs conformations (André et coll., 1995b). Actuellement, on ne sait donc pas si ces molécules présentent, à l'instar des cyclodextrines, une cavité susceptible de recevoir une molécule invitée.

2) Les structures des glucanes cycliques liés en β -1,6 et β -1,3

Bradyrhizobium synthétise des glucanes liés à la fois par l'intermédiaire de liaisons β -1,6 et β -1,3. Ces glucanes cycliques semblent être branchés et possèdent une taille variant de 10 à 13 résidus de glucose par molécule (Miller et coll., 1990).

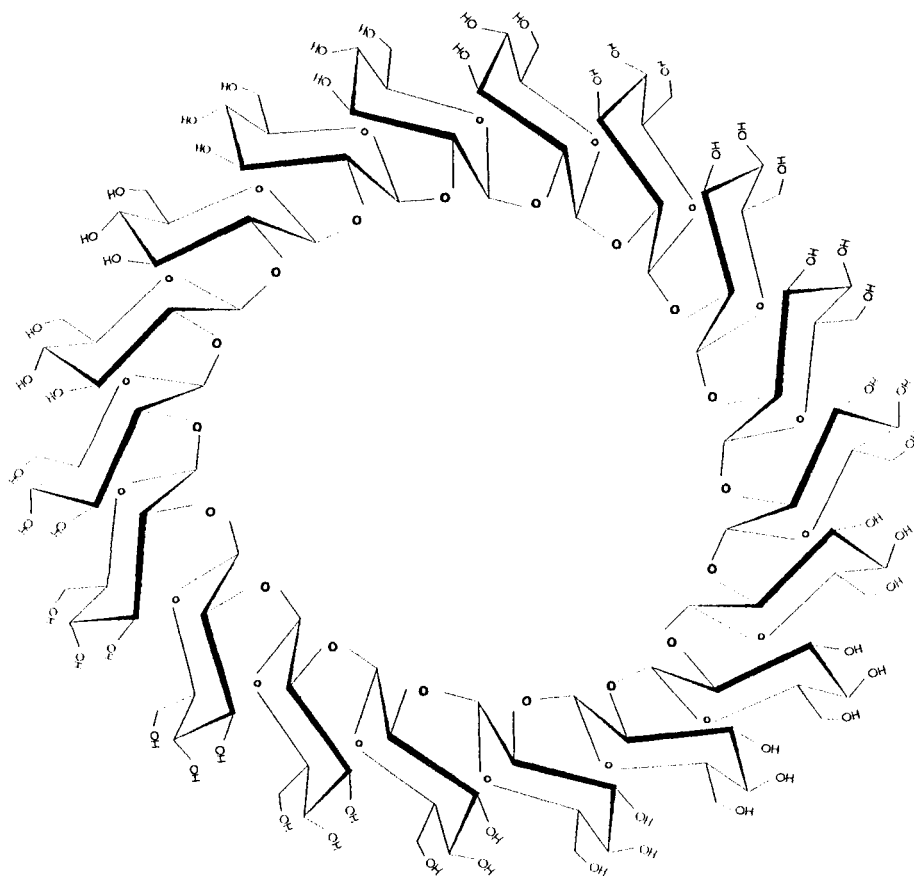


Figure 10 : représentation schématique du glucane cyclique lié en β -1,2 possédant 18 résidus de glucose.

Degré de polymérisation			Espèces représentatives
plus petit	majeur	plus grand	
17	17	20-21	<i>R. phaseolus</i> et <i>R. tropici</i>
17	19-20	26	<i>R. leguminosarum</i> et <i>R. trifolii</i>
17	21-22	40	<i>R. meliloti</i>
17	19-22	25	<i>A. tumefaciens</i>
10	11-12	13	<i>B. japonicum</i>

Tableau 1 : distribution en taille des glucanes cycliques des *Rhizobiaceae*

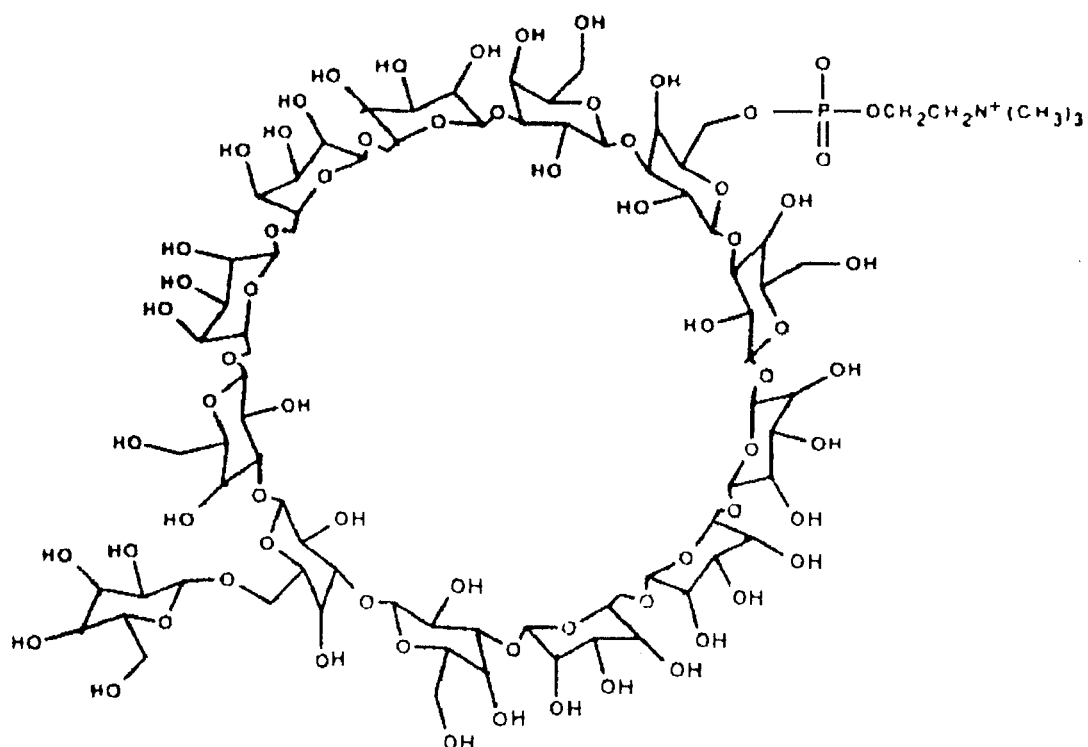


Figure 11 : représentation schématique du glucane cyclique lié en β -1,3 et β -1,6 possédant 13 résidus de glucose et substitué par un résidu de phosphocholine synthétisé par *B. japonicum* (Rolin et coll., 1992).

Les glucanes possédant 11 et 12 résidus de glucose par molécule semblent être prédominants chez au moins deux souches de *Bradyrhizobium*, et les liaisons β -1,3 et β -1,6 sont présentes dans un rapport de 1,6 : 1. Rolin et coll. (1992) ont proposé que la structure du glucane possédant 13 résidus de glucose par molécule s'organisait autour d'un squelette glucidique possédant 12 résidus de glucose par molécule contenant deux trisaccharides liés en β -1,3 séparés par deux trisaccharides liés en β -1,6 ; le treizième résidu de glucose étant supposé être lié en β -1,6 sur un résidu de glucose lié en β -1,3 du cycle (figure 11). Toutefois, la conclusion proposée par ces auteurs me semble en contradiction avec les analyses effectuées sur cette molécule. Notamment, le nombre proposé de 6 résidus de glucose liés en β -1,3 me semble incompatible avec les analyses par méthylation et par RMN.

Il faut noter que la présence de glucanes cycliques possédant un degré de polymérisation inférieur à 17 est possible dans le cas de liaisons β -1,3 et β -1,6 et qu'aucunes études de conformations n'ont été entreprises sur ces glucanes.

3) Les substituants des OPG des *Rhizobiaceae*

Le substituant principal des glucanes cycliques liés en β -1,2 est le *sn*-1-phosphoglycérol, qui dérive des têtes polaires des phosphatidylglycérols (Miller et coll., 1988). Les autres substituants, chez *Rhizobium*, peuvent être des résidus de succinate ou de méthylmalonate (Hisamatsu et coll., 1987). Les résidus de *sn*-1-phosphoglycérol sont liés sur le carbone 6 d'un des résidus de glucose du cycle par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester (Miller et coll., 1986). 50 à 90 % des glucanes sont substitués par un à quatre résidus de *sn*-1-phosphoglycérol par molécule (Miller et coll., 1987 ; Batley et coll., 1987 ; Miller et coll., 1988). Les glucanes neutres sont les précurseurs des glucanes chargés (Geiger et coll., 1991). Le taux de substitution des OPG peut grandement varier au sein des différentes espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*. Par exemple, les OPG produits par certaines souches de *R. leguminosarum* et par *Rhizobium* sp. GRH2 ne sont pas substitués (Lopez-Lara et coll., 1993 ; Zevenhuizen et coll., 1990), alors que 90 % des glucanes produits par *R. meliloti* et *Rhizobium* sp. NGR234 sont substitués (Batley et coll., 1987 ; Miller et coll., 1988). Plus récemment, Breedveld et Miller (1995) ont montré que chez *R. meliloti*, la substitution par les résidus de *sn*-1-phosphoglycérol est inhibée lors d'un transfert dans un milieu à haute osmolarité et que cette substitution s'effectue dans le périplasme. De plus, lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu carencé en phosphate, *R. meliloti* synthétise des glucanes cycliques liés en β -1,2 non substitués par des

résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, mais par un à quatre résidus de succinate par molécule (Breedveld et coll., 1995a). Ce phénomène n'est pas observé chez *A. tumefaciens*, qui ne semble pas être capable de transférer les résidus de succinate sur les OPG. Plus récemment, Breedveld et coll. (1995b) ont caractérisé un nouveau mutant bloqué dans le transfert des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol sur les OPG. Ce mutant synthétise des OPG substitués à un niveau plus élevé par les résidus de succinate, donc possédant une charge globale semblable à celle des OPG produits par la souche sauvage. L'étude de ce mutant a permis de démontrer que comme dans le cas des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, la substitution par les résidus de succinate s'effectue dans le périplasme (Breedveld et coll., 1995b).

Bien que principalement neutres, les OPG synthétisés par *B. japonicum* peuvent être substitués par un résidu de phosphocholine (figure 11). Ce résidu semble être lié sur le carbone 6 d'un des résidus de glucose du cycle (Rolin et coll., 1992).

4) La biosynthèse des OPG des *Rhizobiaceae*

a) Biosynthèse *in vitro* : le système glucosyl-transférase

Les membranes isolées de *R. leguminosarum* pv. *phaseoli* (Amemura, 1984), *R. leguminosarum* (Breedveld et coll., 1992), *R. meliloti* (Zorreguieta et coll., 1985), *A. tumefaciens* (Williamson et coll., 1992), and *A. radiobacter* (Amemura, 1984) catalysent la formation de glucanes cycliques liés en β -1,2, à partir de l'UDP-glucose comme précurseur. Dans tous les cas, l'activité du système glucosyl-transférase mesurée *in vitro* est activée par l'ajout d'ions Mn^{2+} et/ou Mg^{2+} . Il est à noter que les glucanes cycliques formés par le système possèdent la même répartition en tailles que les glucanes synthétisés *in vivo*. Comme chez *E. coli*, les activités des systèmes glucosyl-transférases à partir des membranes d'*A. tumefaciens* et de *R. meliloti* (Zorreguieta et coll., 1990) sont réduites par la présence d'osmolytes ioniques, mais pas par la présence d'osmolytes neutres.

Une activité glucosyltransférase a été identifiée à partir de préparations de membranes de *B. japonicum* (Cohen et Miller, 1991 ; Iñón de Iannino et Ugalde, 1993). Cette activité catalyse la formation de glucanes cycliques à partir d'UDP-glucose et est stimulée par l'ajout d'ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} . De plus, ces composés possèdent une moyenne de 13 résidus de glucose par molécule, comme le montre l'analyse par chromatographie de tamisage moléculaire, et ils sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,3 et β -1,6. On pense que cette activité glucosyltransférase est responsable de la synthèse des OPG de *B. japonicum*. Toutefois, la structure de ces glucanes

semble différente de ceux produits *in vivo*. En effet, le rapport des liaisons β -1,6 aux liaisons β -1,3 est de 1 : 10 chez les glucanes produits *in vivo*, alors que ce rapport est de 1,6 : 1 chez les glucanes produits *in vitro* (Miller et coll., 1990). Iñón de Iannino et Ugalde (1993) proposent comme structure celle d'un cycle de 11 résidus de glucose liés en β -1,3 possédant un nombre variable de résidus de glucose branchés en β -1,6.

b) Deux locus chromosomiques sont responsables de la synthèse des glucanes cycliques liés en β -1,2

En 1985, Douglas et coll. identifièrent deux locus sur le chromosome d'*A. tumefaciens*, *chvA* et *chvB* (*chv* pour « chromosomal yirulence »). Ces deux locus sont nécessaires à la fois à la virulence et à l'adhésion des bactéries sur les cellules des plantes. Peu de temps ensuite, Puvanesarajah et coll. (1985) ont montré que les mutants *chvB* ne synthétisent plus les glucanes cycliques liés en β -1,2 et Dylan et coll. (1986) ont démontré que *R. meliloti* possèdent deux locus (*ndvA* et *ndvB* ; *ndv* pour « nodule development ») qui possèdent une similitude de séquence avec *chvA* et *chvB*. De plus, des expériences de complémentation intergénériques ont montré qu'une identité fonctionnelle accompagne cette identité structurale (Dylan et coll., 1986). Ces gènes sont dans tous les cas chromosomiques et adjacents. Les mutants *ndvA* et *ndvB* forment chez la luzerne des nodules vides de bactéroïdes, inefficaces dans la fixation de l'azote, et ils n'accumulent plus de glucanes cycliques liés en β -1,2 dans le périplasme (Geremia et coll., 1987 ; Stanfield et coll., 1988). Ces études montrent un rôle des glucanes périplasmiques dans les processus d'infection de *R. meliloti* et d'*A. tumefaciens*.

Altabe et coll. (1990), suggérèrent que seuls ces deux locus sont nécessaires à la synthèse des OPG de *R. meliloti* et d'*A. tumefaciens*. En effet, ces auteurs ont obtenu un clone d'*Azospirillum brasilense* contenant un cosmide portant les gènes *chvA* et *chvB*. Une préparation de membranes de ce clone synthétise des glucanes cycliques liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose contrairement à la souche sauvage d'*A. brasilense*.

Lepek et coll. (1990) ont étudié l'influence des gènes *chvA* et *chvB* sur le degré de substitution des glucanes cycliques liés en β -1,2. Dans cette étude, un cosmide possédant les deux gènes a été introduit dans une souche de *R. loti*. Les OPG de *R. loti* sont normalement plus chargés (approximativement 90 % de glucanes chargés) que les OPG d'*A. tumefaciens* (approximativement 50 %). Le clone de *R. loti* possédant le cosmide synthétise des OPG possédant le même taux de substitution que les OPG d'*A. tumefaciens*. La synthèse et la structure du squelette glucidique semblent donc conditionner le niveau de substitution des OPG.

c) Les protéines NdvA/ChvA sont impliquées dans le transport des OPG

Les gènes *ndvA* et *chvA* codent respectivement une protéine de 67 et 65 kDa (Stanfield et coll., 1988 ; Cangelosi et coll., 1989 ; Iñón de Iannino et Ugalde, 1989). Ces protéines présentent 76 % d'homologie pour la séquence en acides aminés, et ces deux protéines présentent une forte homologie avec un grand nombre de protéines bactériennes de transport dépendant de l'ATP. La plus grande homologie trouvée est celle avec HlyB, qui est impliqué dans le transport de l'hémolysine chez *E. coli* (Stanfield et coll., 1988 ; Cangelosi et coll., 1989). Sur la base de cette homologie, il a été proposé que les protéines NdvA et ChvA soient impliquées dans le transport des glucanes cycliques liés en β -1,2 vers le périplasme. Afin d'étayer cette hypothèse, il a été montré que les mutants *chvA* et *ndvA* n'accumulaient plus de glucanes dans le périplasme (Stanfield et coll., 1988 ; Cangelosi et coll., 1989), et qu'un mutant *ndvA* accumulait dans le cytoplasme une moindre quantité de glucanes non substitués possédant une distribution en taille identique à celle de la souche sauvage (Breedveld et coll., 1994). NdvA et ChvA ne sont donc pas impliquées dans les processus de cyclisation et d'élongation des glucanes, mais bien dans le transport de ces composés vers le périplasme. Si l'on ne connaît pas encore ce mécanisme, il doit vraisemblablement différer de celui de l'hémolysine, qui est une molécule directement excrétée dans le milieu sans étape d'accumulation dans le périplasme.

d) Les protéines NdvB/ChvB synthétisent les glucanes cycliques liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose

Les gènes *chvB* et *ndvB* codent deux protéines de haute masse moléculaire (319 kDa) qui sont impliquées dans la biosynthèse des glucanes cycliques liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose (Zorreguieta et Ugalde, 1986 ; Ielpi et coll., 1990). Ces protéines de la membrane interne semblent être impliquées dans toutes les étapes de la biosynthèse des glucanes (initiation, élongation et cyclisation) et sont liées de façon covalente à la chaîne glucanique en cours de biosynthèse (Zorreguieta et coll., 1986).

Il a également été proposé que ces protéines pouvaient avoir une autre fonction que la synthèse des glucanes cycliques liés en β -1,2 (Ielpi et coll., 1990 ; Bhagwat et coll., 1992). En effet, des études de mutants de délétion ont montré que plus de 40 % de la protéine n'étaient pas impliqués dans la biosynthèse des glucanes. Bien qu'en moindres quantités, les glucanes synthétisés par ces mutants possèdent la même distribution en taille, ainsi que le même taux de substitution que ceux produits par la souche sauvage (Breedveld et coll., 1994).

Les protéines NdvB et ChvB n'ont jamais été purifiées à homogénéité, et Kinoshita et coll. (1991) n'ont rapporté que la purification partielle des synthétases d'*A. radiobacter*.

C) Les OPG synthétisés par d'autres bactéries

Bundle et coll. (1988) ont montré que *Brucella* spp. synthétise des glucanes cycliques liés en β -1,2 identiques à ceux synthétisés par *Rhizobium* et *Agrobacterium*. *X. oryzae* synthétise majoritairement un glucane possédant 16 résidus de glucose par molécule. Ce glucane est lié principalement en β -1,2 avec toutefois la présence d'une liaison 1,6 et d'une liaison en α (Amemura et Cabrera-Crespo, 1986). Des analyses par HPLC semblent indiquer que *X. phaseoli* et *X. campestris* synthétisent ces mêmes composés.

Acetobacter produit des glucanes linéaires, semblant n'être liés qu'en β -1,2 et possédant de 6 à 40 résidus de glucose par molécule, avec une moyenne à 10 résidus de glucose par molécule (Amemura et coll., 1985). *K. pneumoniae* synthétise des glucanes linéaires, liés en β -1,2 et branchés en β -1,6 semblables à ceux d'*E. coli*, mais non substitués (Amemura et Cabrera-Crespo, 1986).

Azospirillum brasilense synthétise des OPG liés en β -1,3 et en β -1,6. Ces glucanes semblent être linéaires et posséder en moyenne 10 résidus de glucose par molécule (Altabe et coll., 1994). Toutefois, les analyses par RMN de ces OPG ne semblent pas clairement indiquer le caractère linéaire de ces composés. Un locus d'*Azospirillum brasilense* peut s'hybrider avec l'ADN d'*A. tumefaciens*, et restaurer le phénotype de virulence d'un mutant *chvB* d'*A. tumefaciens*. De plus, ce locus présente, à partir de son extrémité NH₂, une bonne identité avec le gène *ndvB* de *R. meliloti* (Raina et coll., 1995).

D) Les fonctions possibles des OPG

1) Le rôle des OPG dans l'adaptation à l'osmolarité

Le périplasme est impliqué dans la plupart des échanges de la bactérie avec son milieu. Stock et coll. (1977) ont montré que le cytoplasme et le périplasme sont en équilibre osmotique. A basse osmolarité, l'accumulation de cations fixés dans le périplasme permet de préserver l'équilibre et participe à la formation d'un potentiel de Donnan de part et d'autre de la membrane externe. Kennedy (1987), ainsi que Breedveld et Miller (1994) insistent sur le fait que les OPG qui s'accumulent dans le périplasme des bactéries cultivées à basse osmolarité doivent :

(i) permettre aux bactéries de contrôler le volume des compartiments cytoplasmique et périsplasmique ; (ii) avec leur fort caractère anionique, contribuer à la force ionique du périsplasmique qui semble être importante pour l'activité des porines (Delcour et coll., 1992) ; (iii) participer à la création du potentiel de Donnan à travers la membrane interne ; (iv) par leur forte concentration, faire diminuer la pression de turgescence qui devrait s'exercer sur la membrane interne. Les mutants *ndvA* et *ndvB* de *R. meliloti* et les mutants *chvA* et *chvB* d'*A. tumefaciens* sont affectés lors de la croissance à très basse osmolarité (Cangelosi et coll., 1990 ; Dylan et coll., 1990a). Toutefois, le mutant de *R. meliloti* bloqué dans le transfert des résidus de *sn-1*-phosphoglycérol sur les OPG n'est pas affectés lors de la croissance à très basse osmolarité (Breedveld et coll., 1995b). De plus, il semble surprenant que l'absence d'OPG chez des mutants d'*E. coli* n'affecte pratiquement pas leur croissance à très basse osmolarité. Comme le potentiel de Donnan est indispensable aux cellules, un ou plusieurs mécanismes alternatifs doivent pouvoir suppléer au manque d'OPG chez *E. coli* et maintenir ce potentiel en leurs absences.

2) Le rôle des OPG dans les processus d'infection de la plante

Les meilleures preuves du rôle des OPG dans les processus d'infection de la plante viennent du fait que les mutants *chvA/chvB* d'*A. tumefaciens* (Douglas et coll., 1985 ; Cangelosi et coll., 1987) et *hrpM* de *P. syringae* pv. *syringae* (Mukhopadhyay et coll., 1988) sont avirulents, et que les mutants *ndvA/ndvB* de *R. meliloti* (Dylan et coll., 1986 ; Dylan et coll., 1990b) et les mutants de *B. japonicum* (Bhagwat et Keister, 1995) ne synthétisant plus d'OPG induisent des nodules vides de bactéroïdes chez la luzerne et le soja, respectivement. Il faut noter qu'une addition d'OPG exogènes lors de l'inoculation de souches mutantes *ndv* sur les légumineuses ne permet pas le rétablissement de la symbiose (Dylan et coll., 1990b). Dylan et coll. (1990b) ont cherché des suppresseurs extragéniques des mutations *ndv* ; ils ont ainsi trouvé, à partir de mutants *ndv*, des révertants de symbiose. Ces révertants ne produisent toujours pas d'OPG, mais ils forment des nodules pleins. Il faut noter que ces révertants forment un nombre bien inférieur de cordons d'infection (11 à 23 %) que la souche sauvage. Le locus permettant la suppression du phénotype d'un mutant *ndvA*, présent chez un révertant de symbiose a été déterminé. Il s'agit d'un locus *exo* portant au moins *exoH* et *exoF* (Nagpal et coll., 1992). Le fait qu'un locus intervenant dans la production d'EPS (porteur lui-même d'une mutation), parvienne à restaurer le défaut de symbiose d'un mutant *ndvA* suggérerait que les EPS et les OPG interviennent au même moment dans l'interaction bactérie-plante. Le mutant de *R. meliloti* bloqué dans le transfert des résidus de *sn-1*-phosphoglycérol sur les OPG provoque la formation de nodules actifs dans la fixation de

l'azote (Breedveld et coll., 1995b). La présence de ce substituant ne semble donc pas jouer un rôle dans les processus d'infection de la plante.

3) Le rôle des OPG dans l'intégrité de l'enveloppe

Les bactéries mutantes ne synthétisant plus d'OPG possèdent une enveloppe dont de nombreuses propriétés ont changé : (i) une motilité diminuée accompagnée d'une diminution du nombre de flagelles (Fiedler et Roterling, 1988 ; Cangelosi et coll., 1990 ; Dylan et coll., 1990a) ; (ii) une plus grande résistance à l'infection par certains bactériophages (Dylan et coll., 1986 ; Cangelosi et coll., 1990) ; (iii) une résistance à la protéine de lyse de certains phages (Höltje et coll., 1988) ; (iv) une plus grande sensibilité à certains antibiotiques (Dylan et coll., 1986 ; Fiedler et Roterling, 1988 ; Dylan et coll., 1990a). Le fait que les propriétés de colonisation de la plante par les bactéries ne synthétisant plus d'OPG soient modifiées peut donc être une conséquence de ces modifications de l'enveloppe. Une des évidences que les OPG n'interviennent pas directement dans les processus d'infection de la plante est le fait que les mutants *chvB* d'*A. tumefaciens* ne synthétisent plus une rhicadhésine active (Swart et coll., 1993). La rhicadhésine est une protéine de la membrane externe fixatrice de calcium qui est impliquée dans l'attachement de *R. meliloti* et d'*A. tumefaciens* aux cellules de la plante. L'ajout de rhicadhésine exogène restaure partiellement l'attachement aux cellules des plantes, ainsi que le phénotype de virulence des mutants *chvB*. Plus récemment, Swart et coll. (1994) ont montré que les mutants *chvB* d'*A. tumefaciens* cultivés dans un milieu de haute osmolarité et de forte concentration en calcium synthétisent à nouveau une rhicadhésine active.

But de ce travail

Ce travail présente l'étude de la diversité structurale d'une catégorie de glucides bien particuliers localisés dans le périplasme des bactéries à Gram négatif : les OPG.

En effet, ces glucanes synthétisés par des bactéries d'origine diverse possèdent des caractéristiques structurales très différentes. Ces molécules peuvent-elles donc avoir la même fonction chez ces organismes ?

La complémentarité intergénérique entre le gène de la glucosyl-transférase d'*E. coli* *mdoH* et le gène de virulence *hrpM* de *P. syringae* pv. *syringae* semble montrer que les OPG de *P. syringae* jouent un rôle dans les interactions bactérie-hôte. Il n'existait à ce jour aucune donnée concernant la structure de ces composés. Est-ce que cette bactérie synthétise des OPG homologues à ceux d'*E. coli*, comme le laissait supposer la forte homologie existant entre leur deux glucosyl-transférases ? Nous avons répondu à cette question, et étudié de plus la biodiversité des OPG en choisissant comme modèle biologique celui des interactions bactérie-plante.

Nous avons donc étudié la structure des OPG synthétisés par *Erwinia chrysanthemi* qui est une entérobactérie très proche d'*E. coli* et celle des OPG synthétisés par *Burkholderia solanacearum* et *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, deux bactéries phytopathogènes qui présentent de nombreux caractères de virulence communs, malgré leur éloignement phylogénétique. Cette analyse a été complétée par l'étude des OPG synthétisés par *Azospirillum brasilense* et *Rhodobacter sphaeroides*. Ces études nous permettent de montrer que les bactéries à Gram négatif ont développé des solutions différentes pour aboutir à la synthèse de composés pouvant posséder des fonctions homologues.

RESULTATS

I) Etudes des complémentations intergénériques utilisant les gènes *hrpM* et *mdoH*

L'homologie existant entre MdoH et HrpM laissait penser que ces protéines ont des fonctions homologues chez *Escherichia coli* et *P. syringae* pv. *syringae* (Loubens et coll., 1993a). Cela a été vérifié en introduisant dans une souche mutante *mdoH* un plasmide à copies multiples portant le gène *hrpM* (*orf2*) de *P. syringae* ou le gène *mdoH* d'*E. coli* (Loubens et coll., 1993b). L'extraction des OPG synthétisés par ces souches a été effectuée par la méthode au charbon de bois, après marquage radioactif de ces composés au 2-[³H]-glycérol ou au D-[U-¹⁴C]-glucose. L'analyse par chromatographie de tamisage moléculaire des extraits pyridine sur Sephadex G25 a révélé que la synthèse des OPG était restaurée dans les deux souches. De plus, les profils d'élution obtenus sont similaires, indiquant que les produits formés par l'un ou l'autre des produits des gènes *hrpM* ou *mdoH* possèdent une masse moléculaire moyenne semblable. Cette complémentation fonctionnelle entre les gènes *hrpM* et *mdoH* signifie donc bien que HrpM est la glucosyl-transférase responsable de la biosynthèse des OPG chez *P. syringae* (Loubens et coll., 1993b). Toutefois, les domaines non conservés entre les deux enzymes pourraient affecter l'activité de chaque glucosyl-transférase d'une façon qui conduirait à la formation d'OPG possédant des structures différentes. Par exemple, les deux enzymes pourraient ne pas avoir exactement les mêmes propriétés catalytiques, et conduire à la formation d'OPG dont le squelette glucidique posséderait une taille différente. De plus, on ne connaît pas le processus de ramification. La protéine MdoH serait peut-être capable *in vivo* de permettre la ramification, alors que la protéine HrpM en serait incapable.

J'ai donc cherché à voir si ces deux protéines avaient les mêmes activités enzymatiques et catalysaient la formation d'un même composé. J'ai donc comparé la structure des OPG synthétisés dans *E. coli* grâce à sa propre glucosyl-transférase (souche *mdoH*⁺/*mdoH*⁻) ou grâce à la glucosyl-transférase de *P. syringae* pv. *syringae* (souche *hrpM*⁺/*mdoH*⁻).

A) Effet de la complémentation de *mdoH* par *hrpM* sur la structure des OPG formés.

1) Purification et analyse par tamisage moléculaire

Les souches ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire dans un milieu de basse osmolarité. La chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P6 (figure 12) de l'extrait éthanolique m'a permis d'obtenir un profil chromatographique similaire pour les OPG produits par les deux souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻, indiquant que les OPG produits par les deux souches ont des tailles similaires. De plus ces deux souches synthétisent une quantité égale d'OPG (25 µg de glucose / mg de protéines). Les fractions comprises entre 180 et 280 ml d'élution ont été groupées, dessalées et lyophilisées.

2) Comparaison du squelette glucidique

Les résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse des méthylglucosides obtenus après réduction, méthanolyse et triméthylsilylation des OPG produits par les souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻ sont illustrés sur la figure 13. Le rapport (basé sur celui de la surface des pics) glucose sur glucitol est identique dans les deux cas : 1 molécule de glucitol pour 6,5 molécule de glucose), ce qui correspond à un nombre moyen de 7,5 résidus de glucose par molécule d'OPG. Ce résultat diffère de ceux de Schneider et coll. (1979) qui trouvaient, pour une sous-fraction des OPG d'*E. coli* résultant d'une chromatographie sur DEAE-cellulose puis sur Dowex-1 acétate pH 3,7, un nombre moyen de 10 résidus de glucose par molécule.

Les résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus après perméthylation et hydrolyse des OPG réduits produits par les deux souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻ sont présentés dans le tableau 2.

Nous constatons que les rapports molaires sont similaires dans les deux cas. Le squelette glucidique des OPG produits par les deux souches d'*E. coli* s'organisent bien autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β-1,2 avec les points de branchements doublement substitués en 2 et en 6. Le taux de branchement est identique dans les deux cas (approximativement 3,5 résidus de glucose non branchés pour un résidu de glucose branché). La présence de 4,6-di-O-méthylglucose résulte probablement d'une sous méthylation et non de réelles liaisons en 1,3. Schneider et coll. (1979) avaient trouvé une moyenne d'un résidu de glucose non branché pour un résidu de glucose branché.

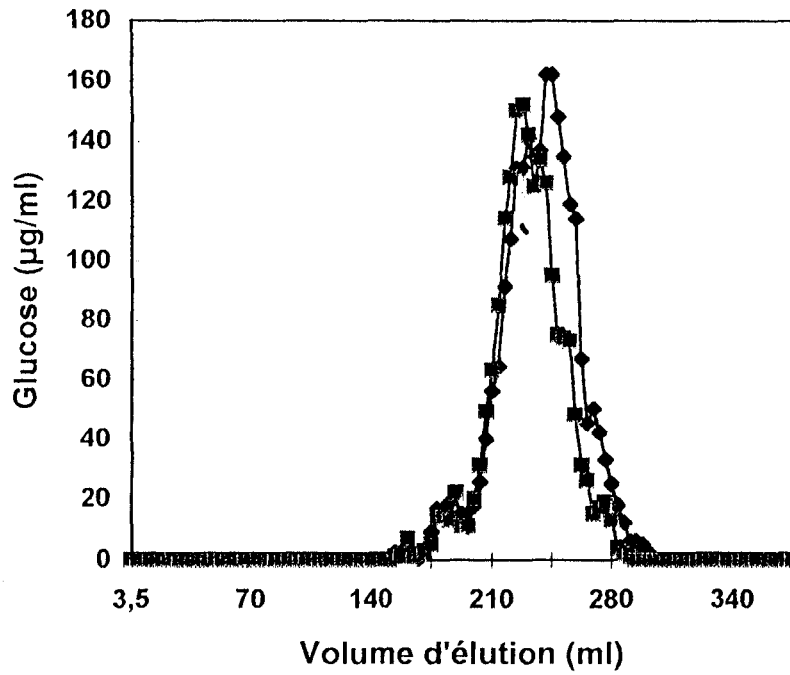


Figure 12 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P6 des OPG synthésés par les souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ (◆) et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻ (■).

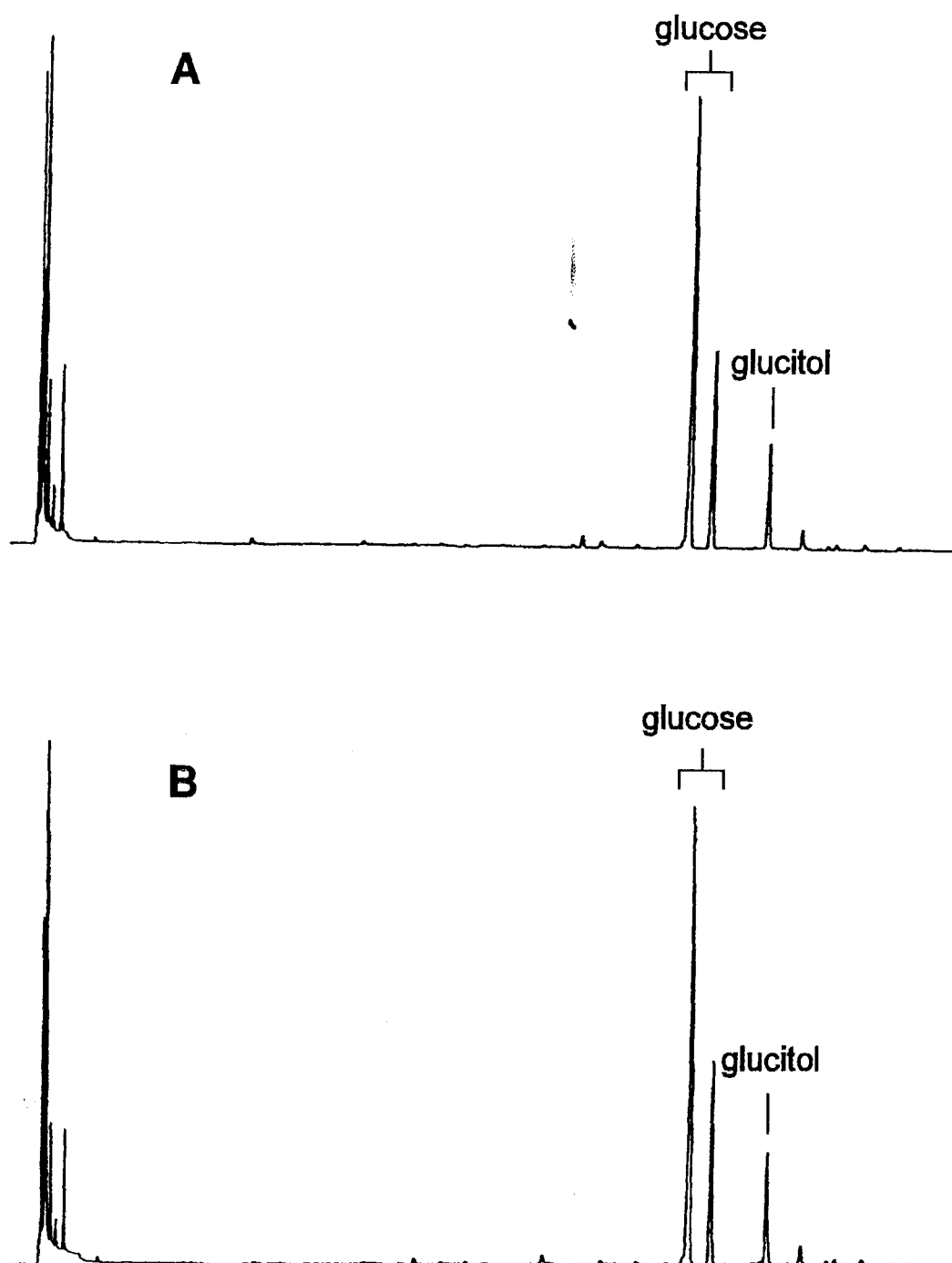


Figure 13 : chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse des OPG réduits suivie de leur triméthylsilylation. (A : $mdoH^+/mdoH^-$; B : $hrpM^+/mdoH^-$).

Ethers méthyliques	Quantité détectée pour les souches :	
	<i>mdoH</i> ⁺ / <i>mdoH</i> ⁻	<i>hrpM</i> ⁺ / <i>mdoH</i> ⁻
Glucose terminal (2,3,4,6-tétra-O-méthylglucose)	1,2	1,1
Glucose réducteur (1,3,4,5,6-penta-O-méthylglucose)	0,2	0,2
Glucose lié en 2 (3,4,6-tri-O-méthylglucose)	3,3	3,5
Glucose lié en 6 (2,3,4-tri-O-méthylglucose)	0,1	0,1
Glucose lié en 2 et 6 (3,4-di-O-méthylglucose)	1,0	1,0
Glucose lié en 2 et en 3 (4,6-di-O-méthylglucose)	0,1	0,1

Les rapports ont été établis en prenant le 3,4-di-O-méthylglucose comme standard arbitraire (valeur de 1,0).

Tableau 2 : Analyse par méthylation des OPG produits par les souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻.

Ces différences peuvent être la conséquence du fait que Schneider et coll. (1979) ont seulement travaillé sur une sous fraction des OPG, ou que j'ai utilisé pour mon étude une souche possédant le gène de la glucosyl-transférase sur un plasmide multi-copie, ce qui provoquerait une surexpression de l'enzyme. De plus, les bactéries utilisées dans l'étude de Schneider et coll. (1979) avait été cultivées en fermenteur et dans un milieu riche. Or, actuellement, on ne connaît pas l'influence des conditions de culture sur la structure du OPG d'*E. coli*.

3) Comparaison du degré de substitution

a) Détermination du rapport glucose/phosphoglycérol

La figure 14 illustre la chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G25 des extraits pyridine des OPG synthétisés par les souches *mdoH⁺/mdoH⁻* et *hrpM⁺/mdoH⁻*. Ces molécules ont été marquées au 2-^[3H]-glycérol avant l'extraction au charbon de bois. Les deux souches utilisées sont auxotrophes pour le glycérol, ce qui permet le dosage de la substitution des OPG produits.

On constate que les deux profils d'élution sont similaires. On détermine le taux de glycérol d'après le calcul de la radioactivité spécifique et on effectue un dosage des sucres sur le matériel radioactif selon la méthode au phénol sulfurique de Dubois et coll. (1956). Le tableau 3 indique les quantités de phosphoglycérol et de glucose, ainsi que le rapport glucose/glycérol obtenus sur les OPG produits par les deux souches. Etant donné que la taille moyenne du squelette glucosidique est de 7,5 résidus de glucose, le nombre moyen de résidus de phosphoglycérol par molécule doit être de 2.

b) Comparaison des OPG formés par l'analyse en HPAEC à haut pH

La figure 15 illustre les résultats de la chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à haut pH des OPG produits par les souches *mdoH⁺/mdoH⁻* et *hrpM⁺/mdoH⁻*. Dans les conditions chromatographiques utilisées, les fonctions hydroxyles des résidus de glucose s'ionisent et l'élution des OPG s'effectue en fonction de la taille des oligosaccharides, ainsi qu'en fonction de la charge globale de la molécule. Nous constatons de nouveau que les profils chromatographiques des OPG produits par les souches *mdoH⁺/mdoH⁻* et *hrpM⁺/mdoH⁻* sont identiques. Il est à noter que dans ces conditions opératoires, les résidus de succinate liés par l'intermédiaire de liaisons O-esters sur la chaîne glucidique sont éliminés.

c) Comparaison des OPG formés par l'analyse en HPAEC à pH 5,5

La figure 16 illustre les résultats de la chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à pH 5,5 des OPG produits par les souches *mdoH⁺/mdoH⁻* et *hrpM⁺/mdoH⁻* dans des conditions opératoires qui permettent uniquement l'ionisation des fonctions acides.

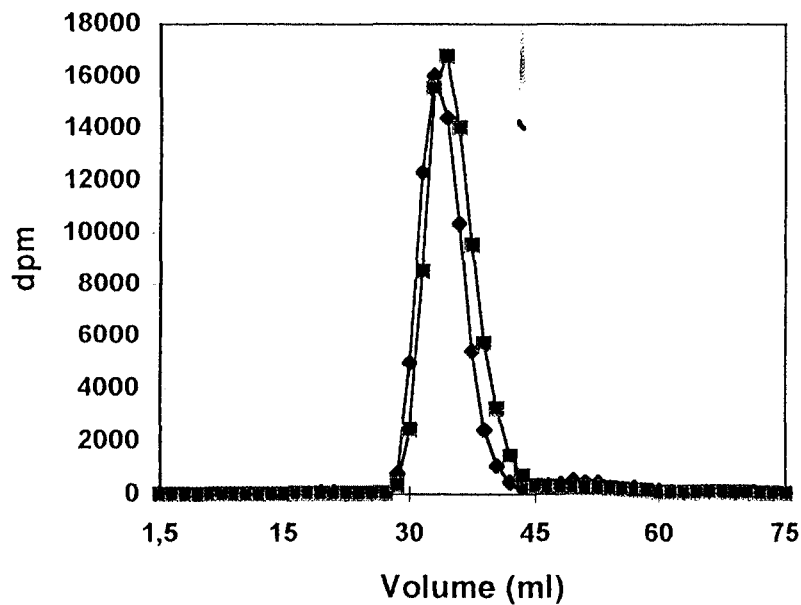


Figure 14 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G25 des OPG marqués au 2-³H-glycérol synthétisés par les souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ (◆) et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻ (■).

Souches	Glycérol (nmoles)	Glucose (nmoles)	Rapport Glc/glycérol
<i>mdoH</i> ⁺ / <i>mdoH</i> ⁻	260	960	3,7
<i>hrpM</i> ⁺ / <i>mdoH</i> ⁻	295	1075	3,6

Tableau 3 : Détermination du rapport glucose/glycérol pour les OPG deux souches *mdoH*⁺/*mdoH*⁻ et *hrpM*⁺/*mdoH*⁻

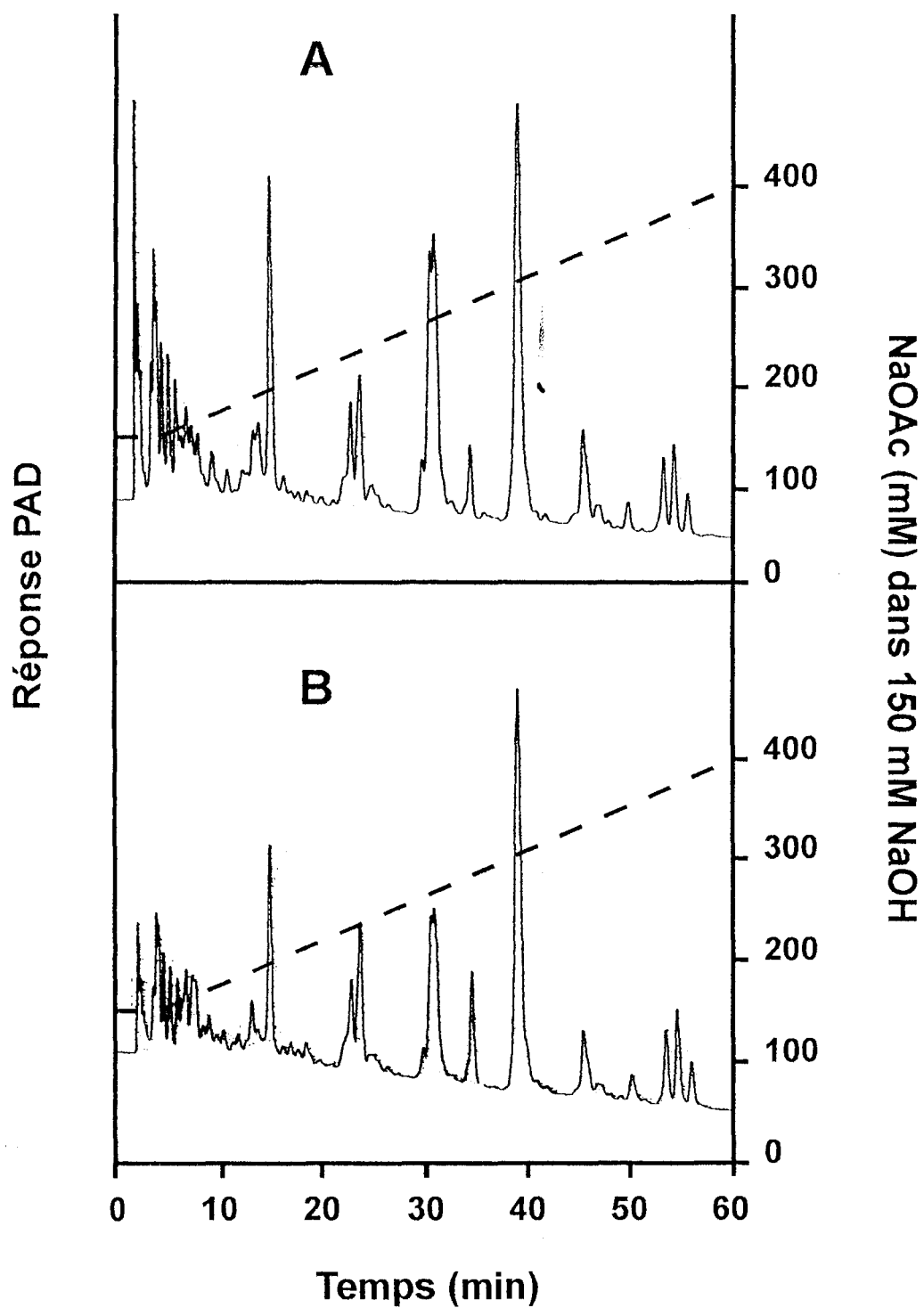


Figure 15 : chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à haut pH des OPG synthétisés par les souches $mdoH^+/mdoH^-$ (A) et $hrpM^+/mdoH^-$ (B).

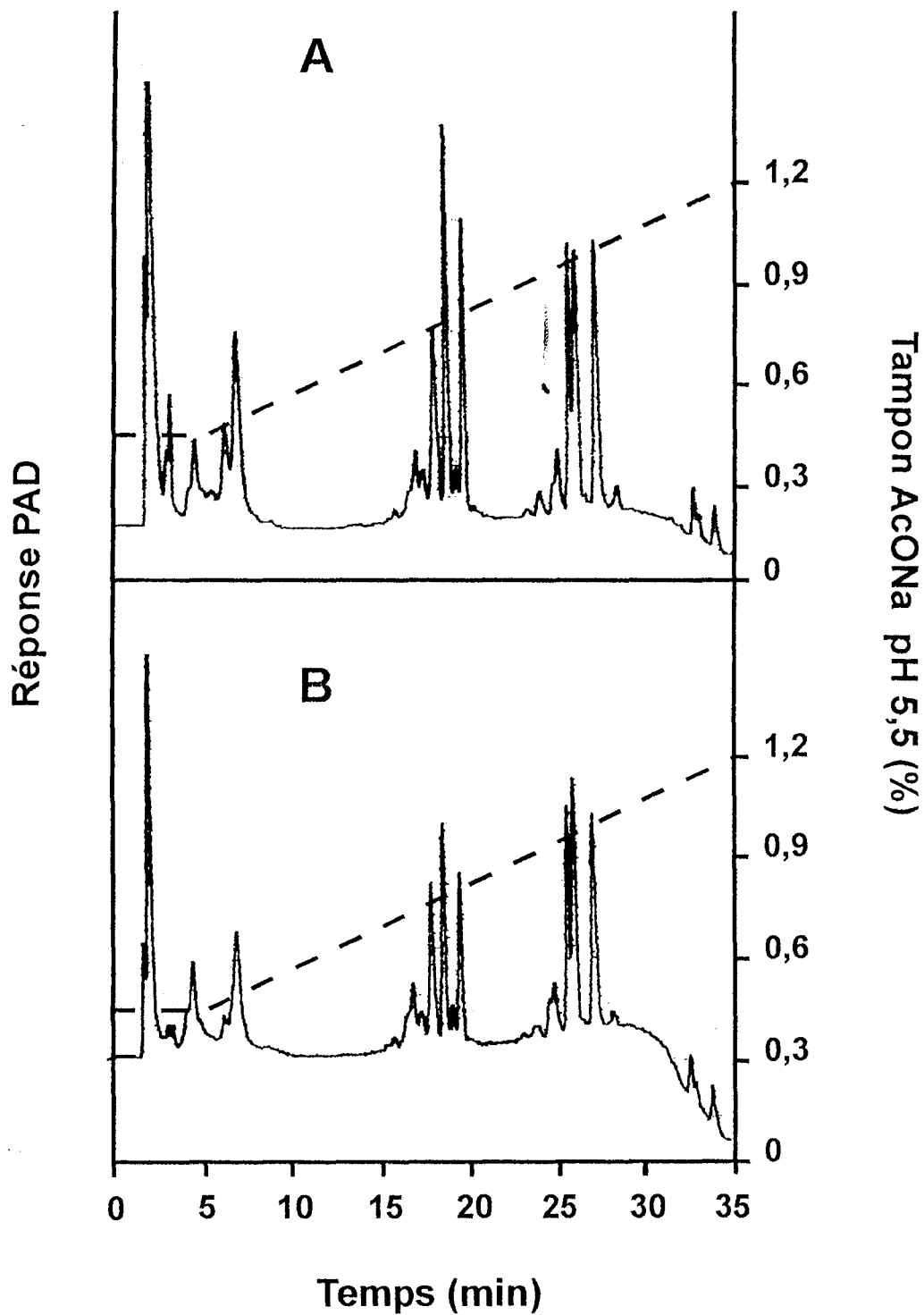


Figure 16 : chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à pH 5,5 des OPG synthétisés par les souches $mdoH^+/mdoH^-$ (A) et $hrpM^+/mdoH^-$ (B).

Comme dans le cas précédent, les OPG des deux souches produisent des chromatogrammes identiques. On constate la présence de trois espèces qui correspondent à des molécules contenant 1, 2 et 3 charges, possédant des temps de rétention moyens de 17, 26 et 32 minutes, respectivement. Townsend et coll. (1989) ont montré que la réponse par détection à champs ampérométrique pulsé (PAD) des oligosaccharides phosphorylés diminue considérablement avec le nombre de résidus phosphate présent sur la molécule. Il est vraisemblable que nous constatons le même phénomène pour les OPG, et donc que la surface correspondante à chacune des espèces n'est pas représentative de leur vraie proportion.

B) *mdoH* restaure la synthèse des OPG chez un mutant *hrpM* de *P. syringae*

Toutes les études précédentes montrent bien que les OPG produits dans *E. coli* grâce à sa propre glucosyltransférase (MdoH) sont identiques aux OPG produits dans *E. coli* grâce à la glucosyltransférase de *P. syringae* (HrpM). Mills et son équipe, de l'Université d'Oregon, ont introduit un plasmide navette portant l'opéron *mdoGH* dans une souche *hrpM* de *P. syringae*. J'ai donc cherché à voir si la synthèse des OPG était restaurée dans cette souche.

La chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 (figure 17) des extraits obtenus à partir des souches *hrpM*⁻, *mdoGH*⁺/*hrpM*⁻ et sauvage (R32) de *P. syringae* démontre que la souche *hrpM*⁻ ne synthétise pas d'OPG (absence de matériel glucidique dans les fractions comprises entre 75 et 100 ml). L'extraction des OPG a été effectuée par la méthode à l'acide trichloroacétique. Par contre, la souche *mdoGH*⁺/*hrpM*⁻ (10 µg de glucose / mg de protéines) synthétise des OPG mais approximativement 6 fois moins que la souche sauvage (59 µg de glucose / mg de protéines).

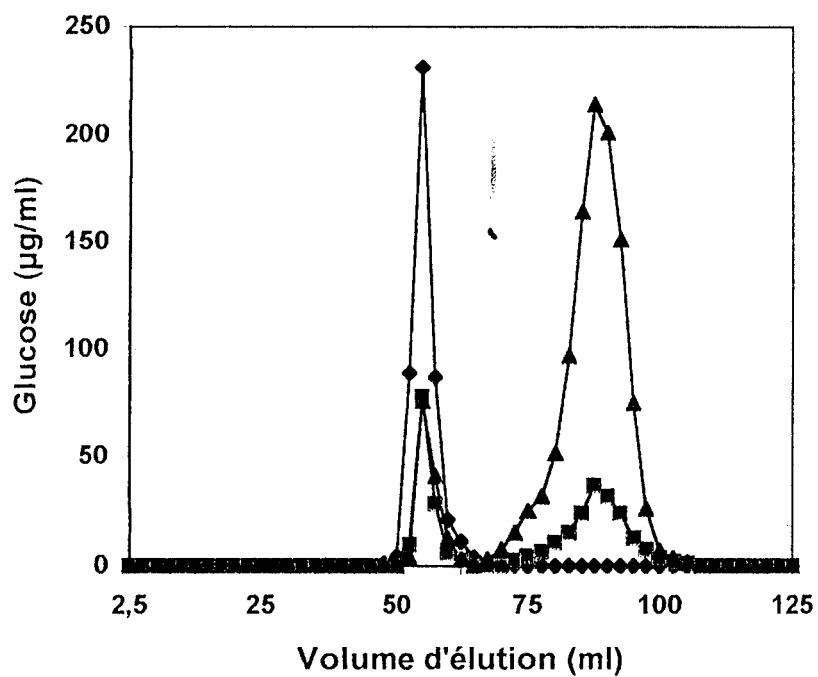


Figure 17 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 des OPG synthétisés par les souches $hrpM^-$ (◆), $mdoGH^+/hrpM^-$ (■), et de type sauvage (▲).

II) Etude de la structure des OPG synthétisés par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Les résultats précédemment obtenus lors de l'étude des complémentations intergénériques utilisant *mdoH* et *hrpM* montraient que les structures des OPG d'*E. coli* synthétisés grâce à sa propre glucosyl-transférase ou grâce à la glucosyl-transférase de *P. syringae* (*hrpM*) sont semblables. En effet, le squelette glucosidique est constitué en moyenne du même nombre de résidus de glucose et il possède le même taux de branchement en β -1,6. Le taux de substitution par les résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, ainsi que l'hétérogénéité en taille et la répartition globale de tous les substituants sont identiques dans les deux cas.

Cette identité de structure implique deux possibilités :

- Les deux glucosyl-transférases ont des propriétés catalytiques identiques ou très semblables, ce qui signifie que les régions non conservées entre ces deux enzymes n'agissent pas de façon déterminante sur l'activité catalytique.

- Ces deux enzymes ont des propriétés catalytiques différentes et des activités enzymatiques complémentaires compensent, chez *E. coli*, ces différences.

C'est pourquoi j'ai entrepris l'étude structurale des OPG synthétisés par *P. syringae* ; article I, ci-après : **Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin.** 1994. Periplasmic Glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:6538-6544.

Ces composés sont localisés dans le périplasme des ces bactéries (figure 1). Leur synthèse est soumise à une régulation dépendante de l'osmolarité du milieu de culture. Ces composés peuvent donc bien être dénommés glucanes périplasmiques osmorégulés.

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire dans un milieu de basse osmolarité. Les OPG ont été extraits par la méthode à l'éthanol et purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire. Les analyses par chromatographie en phase gazeuse après réduction, méthanolyse et triméthylsilylation ont montré que les OPG étaient linéaires et possédaient une moyenne de 8,8 résidus de glucose par molécule. L'analyse par spectrométrie de masse en mode ionisation/désorption laser (figure 2) et par chromatographie en phase super critique (figure 3) a montré que la distribution en taille des OPG variait de 6 à 13 résidus de glucose et qu'ils étaient

dépourvus de tous substituants. Les analyses par méthylation (tableau 1) et résonance magnétique nucléaire (figure 4) démontrent que ces glucanes sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,2 et β -1,6 et que le taux de branchement est très grand (approximativement un résidu de glucose branché pour un résidu de glucose non branché). L'analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions des disaccharides produits après hydrolyse partielle des OPG (figure 5) a révélé la présence de deux disaccharides qui sont le sophorose (Glc β -1,2 Glc) et le gentobiose (Glc β -1,6 Glc) dans le rapport 1,5 : 1. De plus, les études par acétolyse (figure 6) ont démontré que les OPG s'organisent autour d'une chaîne linéaire de résidu de glucose liés en β -1,2, avec les branches constituées d'un seul résidu de glucose lié en β -1,6. Le squelette glucosidique des OPG synthétisés par *P. syringae* est donc similaire à celui des OPG d'*E. coli*. Ceci montre que les deux protéines HrpM et MdoH ont les mêmes activités enzymatiques et catalysent la formation d'un même composé. Toutefois, la différence majeure est qu'ils sont totalement non substitués, contrairement aux OPG d'*E. coli* qui possèdent un très fort caractère anionique. Ces OPG ne peuvent donc pas jouer un rôle dans l'établissement du potentiel de Donnan qui existe de part et d'autre de la membrane externe. De plus, c'est la première mise en évidence d'un OPG non cyclique jouant un rôle dans les interactions bactérie-plante.

Periplasmic Glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*†

PHILIPPE TALAGA, BERNARD FOURNET, AND JEAN-PIERRE BOHIN*

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 18 May 1994/Accepted 29 August 1994

We report the initial characterization of glucans present in the periplasmic space of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (strain R32). These compounds were found to be neutral, unsubstituted, and composed solely of glucose. Their size ranges from 6 to 13 glucose units/mol. Linkage studies and nuclear magnetic resonance analyses demonstrated that the glucans are linked by β -1,2 and β -1,6 glycosidic bonds. In contrast to the periplasmic glucans found in other plant pathogenic bacteria, the glucans of *P. syringae* pv. *syringae* are not cyclic but are highly branched structures. Acetolysis studies demonstrated that the backbone consists of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages. These periplasmic glucans were more abundant when the osmolarity of the growth medium was lower. Thus, *P. syringae* pv. *syringae* appears to synthesize periplasmic glucans in response to the osmolarity of the medium. The structural characteristics of these glucans are very similar to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*, apart from the neutral character, which contrasts with the highly anionic *E. coli* membrane-derived oligosaccharides.

The *Pseudomonas syringae* group of plant pathogenic bacteria contains various pathogens that cause diseases on the foliage of plants. These bacteria are mainly differentiated by the host plants in which they are capable of multiplying and causing disease. *P. syringae* pv. *syringae* is the causal agent of brown spot disease of *Phaseolus vulgaris*, the common bean. Isolation of mutants that were affected in their behavior on plants led to the identification of different types of genes involved in plant-pathogen interactions. The genes required for both the expression of disease symptoms on host plants and the development of the hypersensitive reaction on non-host plants have been designated *hrp* for hypersensitive reaction and pathogenicity (41).

The first *P. syringae* pv. *syringae* *hrp* mutant was obtained by Tn5 mutagenesis of a streptomycin-resistant derivative of strain R32 (2). Complementation of the mutant phenotype and transposon mutagenesis allowed delimitation of the *hrpM* locus to a length of 3.9 kb (29), while sequence analysis revealed two open reading frames, ORF1 and ORF2 (31). The gene for ORF2 was designated *hrpM*. The *hrpM* gene product was predicted to be an 83-kDa protein spanning the cell membrane. Its function was not elucidated; this protein is not required for growth in minimal medium but is required for growth of bacteria in planta (28).

Recently, Loubens and coworkers (20) have discovered considerable homology (69% identical nucleotides out of 2,816) between the *P. syringae* pv. *syringae* *hrpM* locus and the *Escherichia coli* *mdoGH* operon. In *E. coli*, both genes are required for the synthesis of periplasmic glucans (17). The *mdoG* gene product is a 56-kDa periplasmic protein whose function remains to be determined, while the *mdoH* gene product, known to be necessary for glucosyl transferase activity, is a 97-kDa protein spanning the cell membrane (20).

The high degree of homology between these two sets of genes suggested that these genes could have similar functions in both organisms. This was partially confirmed by introducing a multicopy plasmid bearing the *hrpM* gene into an *mdoH* mutant of *E. coli* and restoring the periplasmic glucan synthesis capability (21). Thus, the pathogenicity function of the *hrpM* locus appeared to be related to the synthesis of periplasmic glucans in *P. syringae* pv. *syringae*.

Periplasmic glucans are general components of gram-negative bacteria (37) and share the following features: glucose as the sole sugar, glucose units linked by β -glycosidic bonds, and synthesis under osmotic control and that is inversely correlated to the osmolarity of the growth medium of the cells (26).

Among members of the family *Rhizobiaceae*, periplasmic glucans are cyclic (4). Studies have demonstrated that *Agrobacterium* and *Rhizobium* species synthesize periplasmic glucans with similar structures (3, 10, 16). In both genera, periplasmic glucans are composed of a cyclic β -1,2-glucan backbone containing 17 to 24 glucose residues. Extracts of *Bradyrhizobium* spp. revealed the presence of β -1,6- and β -1,3 cyclic glucans containing 10 to 13 glucose units per ring (25). Periplasmic glucans of *E. coli*, also known as MDOs (membrane-derived oligosaccharides), appear to range from 6 to 12 glucose residues, with the principal species containing 8 or 9 glucose residues (13). The structure is highly branched, the backbone consisting of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages (36).

In *E. coli*, periplasmic glucans are highly substituted with *sn*-1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and succinyl ester residues (14, 40). In *Agrobacterium tumefaciens*, one or more phosphoglycerol moieties are substituted for approximately 50% of the total periplasmic glucans (27). In *Rhizobium meliloti*, anionic moieties may be substituted for as much as 90% of the periplasmic cyclic β -1,2 glucans and the predominant anionic substituent present is phosphoglycerol (24). Other substituents can be methylmalonic or succinic acid residues (11). Periplasmic glucans of *Bradyrhizobium* spp. are predominantly neutral (25), but Rolin and coworkers (34) have purified phosphocholine-substituted β -1,6- and β -1,3-glucans from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

Studies by numerous authors (7, 9, 33) have provided

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 20 43 65 92. Fax: 20 43 65 55. Electronic mail address: BOHIN@CIT12.FR.

† We dedicate this article to the memory of our coauthor, Bernard Fournet, who died on 6 January 1993. We will miss his friendship and enthusiasm for science.

evidence for a role of periplasmic glucans in the plant infection process by members of the family *Rhizobiaceae*. The fact that the pathogenicity locus *hrpM* of *P. syringae* pv. *syringae* appears to be implicated in periplasmic glucan synthesis is consistent with a general role of these compounds in plant infection. We report the results of our analysis of the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *P. syringae* pv. *syringae* R32 (provided by D. Mills, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis) and *E. coli* JM101 (42) were grown in LOS medium [4 g of casein hydrolysate, 2 mg of thiamine, 0.5 mg of FeSO_4 , 18 mg of MgCl_2 , 200 mg of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 175 mg of K_2HPO_4 per liter (pH 7.2)] on a rotary shaker at 24°C for *P. syringae* and at 37°C for *E. coli*. This low-osmolarity medium was estimated to be 70 mosM (18). When necessary, the osmolarity of the medium was increased by the addition of NaCl.

Protein content. The protein content of cell fractions was determined by the method of Lowry et al. (22) with bovine serum albumin as a standard.

Cellular localization. One-hundred-milliliter cultures were harvested during the mid-log phase of growth. Oligosaccharides were released by an adaptation of the procedure of Schulman and Kennedy (37). After centrifugation at 4°C, the cells were gently resuspended at 4°C in 100 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) containing 20% sucrose and 5 mM EDTA and were immediately centrifuged at 4°C. Both the supernatant, containing the EDTA-released material, and the cell pellet, containing the retained fraction, were extracted with 50% ethanol.

Extraction of cell-associated oligosaccharides. Two-liter cultures were harvested during the late stationary phase of growth. Oligosaccharides were obtained by an adaptation of the procedure of Schneider et al. (36). This involved extraction with 50% ethanol, centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min to obtain cell pellets, and concentration of the supernatant by rotary evaporation. The concentrated supernatant was extracted with 2:1 chloroform-methanol and centrifuged. The supernatant was collected as the water-methanol-soluble fraction.

Column chromatographic analysis of cell-associated oligosaccharides. Aqueous methanol extracts were concentrated to a minimum volume and desalted on a Sephadex G-15 (Pharmacia) column (2.2 by 150 cm) at room temperature with H_2O as the eluant at a flow rate of 20 ml/h. Fractions of 4 ml were collected and assayed for total carbohydrates by the phenol-sulfuric acid method (5). Fractions containing sugars eluted in the void volume and were pooled, concentrated, and analyzed by gel filtration chromatography on a Biogel P-6 (Bio-Rad) column (1.6 by 70 cm) as described in the legend to Fig. 1. Fractions containing oligosaccharides, eluting in the volume between 100 and 130 ml, were pooled and lyophilized.

Fifty micrograms of the oligosaccharides was analyzed by high-performance anion-exchange chromatography (HPAE) on a Dionex CarboPac PA-100 column (4 by 250 mm) and monitored with a pulsed amperometric detector. Separations were carried out at pH 6.0 at a flow rate of 1 ml/min. The program used was as follows: isocratic elution at 100% eluant 1 (10 mM sodium acetate buffered to pH 6.0 with acetic acid) for 5 min, followed by a linear increase to 10% eluant 2 (1 M acetate, pH 6.0) at 30 min to 50% eluant 2 at 70 min, followed by isocratic elution for 5 min under the latter condition.

Compositional analysis of cell-associated oligosaccharides.

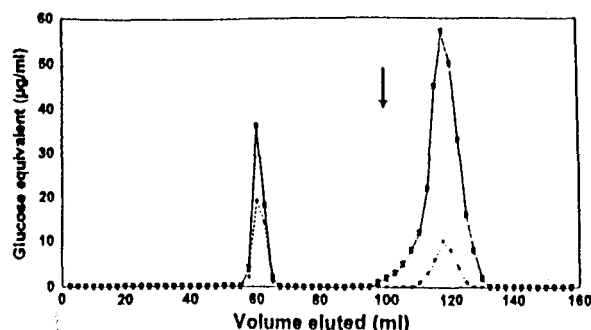


FIG. 1. Cellular localization of the oligosaccharides in *P. syringae* pv. *syringae*. The oligosaccharides were released as described in Materials and Methods. Both the supernatant (■), containing the EDTA-released material, and the cell pellet (●), containing the EDTA-retained material, were extracted in 50% ethanol. The desalted aqueous methanol extracts were concentrated and applied to a column (70 by 1.6 cm) of Biogel-P6. The column was eluted at room temperature at a flow rate of 15 ml/h with 0.5% acetic acid. Fractions (2.5 ml) were collected and assayed for total carbohydrates by the phenol-sulfuric acid method. The arrow indicates the position expected for MDOs as determined by calibration with a purified standard derived from *E. coli* JM101. Results are expressed as micrograms of glucose equivalent per milliliter of eluant.

Oligosaccharide preparations were subjected to a variety of chemical analyses. Total monosaccharide compositional analysis was performed by gas-liquid chromatography after methanolysis, acetylation, and trimethylsilylation reactions (30). Reducing sugars were measured with the same method after reduction of the oligosaccharides with sodium borohydride. Succinate, glycerol, and monosaccharides were analyzed by high-performance liquid chromatography on a Biorad HPX-87H column (7.8 by 300 mm) after hydrolysis for 4 h in 4.0 N trifluoroacetic acid at 100°C. Total phosphorus was measured as P_i by HPAE with a conductivity detector equipped with a Dionex IonPac AG4A-SC column (4 mm in diameter [10–32]) after hydrolysis for 6 h in 6.0 M HCl at 100°C.

Partial acid hydrolysis. Partial acid hydrolysis of the oligosaccharides (1 mg) was performed with trifluoroacetic acid (0.2 N for 3 h at 100°C). After elimination of trifluoroacetic acid in a desiccator, 100 µg of the hydrolysate was directly analyzed by HPAE with pulsed amperometric detection on a Dionex CarboPac PA-1 (4 by 250 mm) by using isocratic elution with 50 mM NaOH at a flow rate of 1 ml/min.

Acetolysis. Acetolysis of the oligosaccharides (2 mg) was performed according to the method of Dubourdieu et al. (6) in 10:10:1 acetic anhydride-acetic acid- H_2SO_4 (1 ml). After acetolysis, the carbohydrates present in the residue were eluted from a column (1.6 by 65 cm) of Biogel-P2 (Bio-Rad) with water as the eluant at a flow rate of 10 ml/h. Fractions of 2 ml were collected, and those containing sugars were pooled and lyophilized.

Matrix-assisted UV-LD-MS. For matrix-assisted UV laser desorption mass spectrometry (UV-LD-MS), oligosaccharides were dissolved in water at a concentration of about 1 g/liter and mixed in a ratio of 1:5 with the matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid, 10 g/liter dissolved in 10% aqueous ethanol solution) and mass spectra were recorded on a VISION 2000 instrument (FINNIGAN MAT Ltd., Paradise, United Kingdom), which consisted of an LD ion source coupled to a time-of-flight mass analyzer. Light from a frequency-quadrupled Nd-YAG laser, which operated at a wavelength of 355 nm, was focused onto

the sample target with a single fused silica lens. Each pulse of desorbed ions was accelerated to 20 keV of energy for detection. The spectra acquired consisted of the sum of 20 acquisitions to increase the signal/noise ratio.

SFC. Five hundred micrograms of the oligosaccharides dissolved in 100 μ l of pyridine was silylated in 200 μ l of HMDS-TMCS (5:1 [vol/vol] 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazan [Merck]-trimethylchlorosilan [Fluka]) for 1 h at 80°C and left overnight at room temperature. Supercritical fluid chromatography (SFC) of the silylated oligosaccharides was carried out with a Brownlee syringe pump equipped with a 60- μ l Valco injection valve. All separations were performed on a DB 5 (diphenyl-dimethylpolysiloxane [1:1]) capillary column (0.1- μ m-film thickness, 50- μ m internal diameter by 10 m; J&W Scientific, Folsom, Calif.) placed in a gas chromatography oven (Carlo Erba), with flame ionization detection. The mobile phase was CO₂ (SFC grade; Prodair, Lille, France). During chromatography, the oven temperature was maintained at 120°C. Sample elution was achieved with the following programmed pressure increase: 5-min hold at 150 atm (15,193.50 kPa) and then a linear increase to 410 atm (41,528.90 kPa) at a rate of 6.5 atm (658.39 kPa)/min.

NMR analysis. The 100-MHz ¹³C nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) spectra were recorded at 25°C on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5-mm mixed ¹H-¹³C probe head operating in the pulsed F.t. mode and controlled by an Aspect 3000 computer with an array processor. The ¹³C experiments were performed with the standard Bruker pulse program, POWGATE, with ¹H broadband composite pulse decoupling. Nonselective polarization transfer spectroscopy was also used to assign ¹³C spectra. Twenty milligrams of the oligosaccharides was dissolved in 0.5 ml of D₂O. A 90° pulse (4.8 μ s) and a 1.0-s recycle delay were used in each experiment. The chemical shifts are given relative to the methyl of internal acetone (δ CH₃ = 31.55 ppm under the conditions used).

Methylation analysis. Glycosidic linkage analysis was performed by methylation according to the method of Paz Parente et al. (32). The methyl ether compounds were analyzed as the partially methylated and acetylated alditols obtained after hydrolysis (trifluoroacetic acid [4 N at 100°C for 4 h]), reduction with sodium borohydride, and peracetylation and as the partially methylated and acetylated methylglucosides obtained after methanolysis (MeOH-HCl [0.5 N at 80°C for 24 h]) of permethylated oligosaccharides and peracetylation, by gas chromatography MS according to the method of Fournet et al. (8).

Fast atom bombardment MS. Mass spectra of permethylated oligosaccharide samples were recorded on a concept 2 H-H mass spectrometer (Kratos Analytical Instrument, Urms-tom, Manchester, United Kingdom) equipped with a DS 90 (DG DG/30) data system. The mass spectrometer was operated at an 8-keV accelerating potential. An Ion Tech model B 11 NF saddle field fast atom source energized with the B50 current-regulator power supply was used with xenon as the bombarding atom (operation condition, 7.3 kV, 1.2 mA). The mass range 3,000 to 400 was scanned at 10 s/decade. The methylated oligosaccharides were analyzed in positive mode with thioglycerol in the presence of 0.5 M sodium acetate as matrix.

RESULTS

Cell-associated oligosaccharides of *P. syringae* pv. *syringae* are localized in the periplasmic space. Cells of *P. syringae* pv. *syringae* were grown in a medium of low osmolarity, and the

cultures were treated with 50% ethanol (see Materials and Methods). Analysis of the ethanol-soluble fraction by Biogel P-6 chromatography revealed the presence of a large peak of glucose-containing material (data not shown). A compositional analysis of this material was performed and revealed the presence of glucose and the absence of succinic acid, glycerol, or phosphorus. In contrast, when the cells were harvested by centrifugation, the supernatant contained only 22% of these oligosaccharides. Treatment of the cells with EDTA in the presence of 20% sucrose led to the release of 88% of the total cell-associated oligosaccharides (fractions 100 to 130 [Fig. 1]). Under these conditions, which avoid osmotic shock, these oligosaccharides could be readily extracted. This finding indicated that cell-associated oligosaccharides are localized in the periplasmic space of the bacteria, in common with the MDOs of *E. coli* (37) and the cyclic glucans of members of the family *Rhizobiaceae* (23, 26). It should be noted that a low level of oligosaccharides was found in the culture medium, comparable with that observed for *E. coli*. Comparison of elution volumes on Biogel-P6 indicated that the oligosaccharides extracted from cultures of *P. syringae* pv. *syringae* were smaller than the MDOs of *E. coli* (Fig. 1).

Biosynthesis of the periplasmic oligosaccharides of *P. syringae* pv. *syringae* is regulated by the osmolarity of the growth medium. When cells of *P. syringae* pv. *syringae* were grown in LOS medium supplemented with 0.2 or 0.4 M NaCl, the amount of periplasmic oligosaccharides recovered in the Biogel-P6 peak (Fig. 1) was strikingly reduced as follows. With no addition, the periplasmic oligosaccharide content (micrograms of glucose per milligram of cell protein) was 52; with 0.2 and 0.4 M NaCl added, the periplasmic oligosaccharide contents were 15.5 and 9, respectively. Synthesis of the periplasmic glucans in cells grown in medium of low osmolarity was approximately 3.5 times higher than that in cells grown in the same medium including 0.2 M NaCl and 6 times higher than that in cells grown in the same medium including 0.4 M NaCl.

Periplasmic oligosaccharides of *P. syringae* pv. *syringae* are neutral glucans, are acyclic, and are the same size as the MDOs of *E. coli*. The apparent difference in size between the periplasmic oligosaccharides of *P. syringae* pv. *syringae* and the MDOs of *E. coli* was resolved after further fractionation of these compounds by HPAE at pH 6.0 as described in Materials and Methods. The periplasmic oligosaccharides of *P. syringae* pv. *syringae* were found to elute in the void volume (data not shown), which is indicative of an unsubstituted, neutral character. This is in contrast to the highly anionic character of the MDOs of *E. coli* (14). Gas chromatographic analysis of the oligosaccharide preparations after methanolysis, re-N acetylation, and trimethylsilylation reactions confirmed that glucose was the only monosaccharide present in the preparations, indicating the absence of contaminating lipo- or extracellular polysaccharide material. In contrast, a compositional analysis of the material eluting in the void volume of the Biogel-P6 column (fractions 55 to 65 [Fig. 1]) revealed the presence of rhamnose, a monosaccharide found in the O-specific antigen of *P. syringae* pv. *tomato* (15). The same analysis was performed after reduction of the periplasmic glucans and showed a ratio of 7.8 glucose residues per glucitol unit in the reduced oligosaccharides, consistent with an average of 8.8 glucose units/mol of the oligosaccharides. Moreover, this result demonstrates that the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* are not cyclic in nature and thus differ from the glucans of the family *Rhizobiaceae* but are similar to the MDOs of *E. coli*.

The molecular weight distribution of the glucans of *P. syringae* pv. *syringae* was determined by matrix-assisted UV-LD-MS as described in Materials and Methods. This analysis

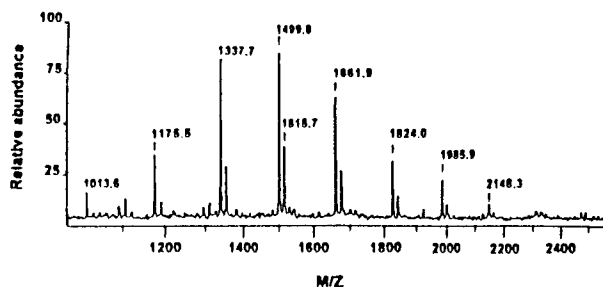


FIG. 2. Matrix-assisted UV-LD-MS of the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae*. The mass spectra were recorded as described in Materials and Methods. Molecular weights measured by this technique correspond to the chemical molecular weight of the cationated species $[M + Na]^+$ or $[M + K]^+$.

revealed the presence of eight sodium-cationized molecular ions, $[M + Na]^+$, at m/z 1,013.6, 1,175.5, 1,337.7, 1,499.8, 1,661.9, 1,824.0, 1,985.9, and 2,148.3 respectively (Fig. 2). These molecular ion species have the same masses as would be expected for linear glucans composed of 6 to 13 glucose residues with the principal species containing 8, 9, and 10 glucose residues. The minor peaks in front of the sodium-cationized ions are attributed to $[M + K]^+$ ions.

The detection of these species by matrix-assisted UV-LD-MS is consistent with the results obtained by SFC with flame ionization detection. The SFC chromatogram of the silylated glucans of *P. syringae* pv. *syringae* (Fig. 3B) showed numerous peaks with the same retention time distribution as that expected for silylated glucans composed of 6 to 10 glucose residues (Fig. 3A). These results are concordant with those obtained by Kennedy and coworkers for the MDOs of *E. coli* (13).

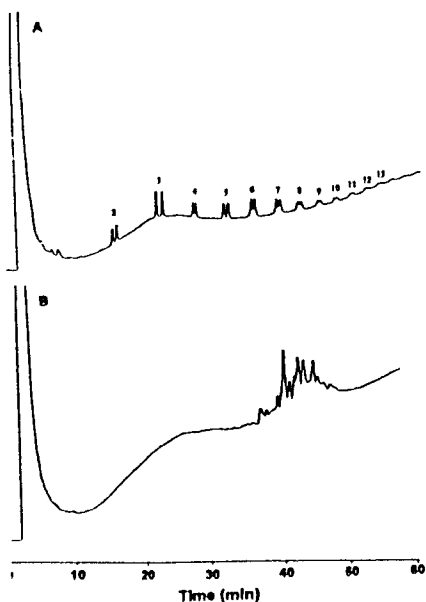


FIG. 3. SFC analysis. Oligosaccharides were examined by SFC as described in Materials and Methods. (A) Maltooligosaccharide standards. (B) Periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae*. The number beside each peak indicates its degree of polymerization.

Periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* are linked primarily by β -1,2 and β -1,6 glycosidic bonds, and the structures are highly branched. ^{13}C -NMR analysis of the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* revealed the presence of β glycosidic linkages and the absence of α glycosidic linkages (Fig. 4). The NMR spectra of the periplasmic glucan preparations contained C-1 resonance peaks clustered near 104 ppm. This shift is indicative of the β glycosidic linkage (39). The peaks near 70 ppm are indicative of the presence of β -1,6 linkages and represent the resonances for both C-4 and C-6 (β -1,6) carbons (39). The C-6 assignment was confirmed by a nonselective polarization transfer (INEPT) technique, showing the characteristic CH_2 negative signal. The resonances near 83 ppm can be assigned to C-2 in β -1,2 glycosidic linkages. Peaks near 62 ppm are indicative of C-6 carbons not involved in glycosidic linkages (39).

The noncyclic nature of the glucans was confirmed by the presence of resonances at 96 and 92.5 ppm, which correspond to the β and α anomeric carbons, respectively, of the reducing-glucose residues. Furthermore, the resonances at 72.7 ppm could be assigned to the C-3 and C-5 of the α anomer of the reducing-glucose residue, while the corresponding smaller signals of the β anomer should be part of the complex of signals at ca. 75 ppm. Peaks near 75 ppm are indicative of C-2 not involved in glycosidic linkages, and the resonances near 77.5 ppm may be assigned to both C-5 and C-3 not involved in glycosidic linkages.

Characteristic of the NMR spectra of all the glucan preparations is the presence of irregular multiple resonances for all carbons. This may be due to the variation in size of the glucan molecules, as previously observed by Dell and coworkers (4) for the neutral cyclic β -1,2-glucans, and to the fact that there is no repetition unit in the sequences of these oligosaccharides.

The presence of 1,6 and 1,2 glycosidic linkages within *P. syringae* pv. *syringae* periplasmic glucans, determined by ^{13}C -NMR, was confirmed by methylation followed by gas chromatography MS analysis. The results of the methylation analysis (Table 1) revealed equivalent amounts of 3,4-di-, 3,4,6-tri-, and 2,3,4,6-tetra-*O*-methylglucose. This fact indicated that the glucans are highly branched structures with the branch points doubly substituted at positions 2 and 6. The presence of a minor amount of 1,3 glycosidic bonds should be noted.

HPAE analysis of the partial hydrolysate of the glucan preparations revealed the presence of two disaccharide components (Fig. 5). These components were shown to coelute with sophorose (2-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucose; 60% of the total disaccharides) and gentiobiose (6-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucose; 40% of the total disaccharide). Thus, the glucose units are joined by 1,2 and 1,6 glycosidic linkages in an apparent ratio of 1.5:1.

The periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* consist of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages. 1,6 Glycosidic linkages in oligo- and polysaccharides are preferentially cleaved during acetolysis, and the relative rate for β -1,3 and β -1,6 linkages in disaccharides is 1:41 (35). After acetolysis of the periplasmic glucan preparations, gel filtration separation on Biogel-P2 gave only two fractions. The first (with the highest molecular weight) was eluted near the void volume, and the glycosidic linkage analysis showed the presence of 1,2 (95%) and 1,6 (5%) glycosidic bonds. This is consistent with (1,2)-linked oligosaccharides resulting from almost complete cleavage of the branched chains. Fast atom bombardment MS analysis revealed the presence of four major sodium-cationized molecular ions, $[M + Na]^+$, with masses of 885, 1,089, 1,293, and 1,497 (Fig. 6). These molecular ion species had the same

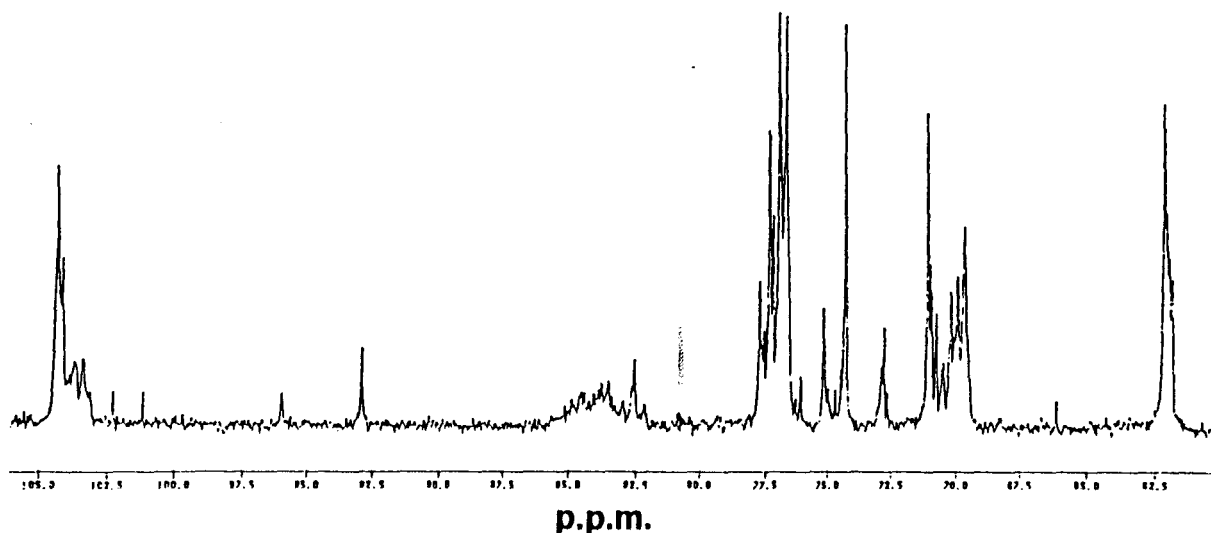


FIG. 4. ^{13}C -NMR analysis of periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae*. NMR spectra were recorded as described in Materials and Methods.

masses as would be expected for linear glucans consisting of four to seven glucose residues. In addition to the major ions, there were two less-abundant sodium-cationized ions with masses of 1,701 and 1,905, which correspond to those expected for linear glucans composed of eight and nine glucose residues, respectively. The minor peaks in front of the sodium-cationized ions are attributed to the thioglycerol-adducted ions.

The second fraction, which eluted at the total volume, was composed solely of glucose monomers, suggesting the presence of single D -glucosyl groups as side chains. Thus, the glucans of *P. syringae* pv. *syringae* are organized as a β -1,2-linked glucose backbone—with a size ranging from four to seven glucose residues—to which the branches are attached by β -1,6 linkages.

DISCUSSION

As expected from the strong similarity observed between the *hgpM* gene product and the *MdoH* glucosyltransferase of *E. coli* (20, 21), *P. syringae* pv. *syringae* produces glucans fundamentally similar to the MDOs of *E. coli*, with a small size,

TABLE 1. Methylation analysis of periplasmic glucans from *P. syringae* pv. *syringae*

Carbohydrate ^a	Amt detected after ^b :	
	Acid hydrolysis and peracetylation	Methanolysis and peracetylation
Terminal Glc (2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methylglucose)	1.5	1.0
2-Linked Glc (3,4,6-tri- <i>O</i> -methylglucose)	1.2	1.0
6-Linked Glc (2,3,4-tri- <i>O</i> -methylglucose)	0.2	0.1
2,6-Linked Glc (3,4-di- <i>O</i> -methylglucose)	1.0	1.0
2,3-Linked Glc (4,6-di- <i>O</i> -methylglucose)	0.1	0.1

^a As glucitol acetates after acid hydrolysis and peracetylation and as methyl-*O*-acetylglucosides after methanolysis and peracetylation as described in Materials and Methods.

^b The amounts (as determined from peak areas in the gas chromatographic profiles) were compared by taking 3,4-di-*O*-methylglucose as an arbitrary standard (assigned a value of 1).

ranging from 6 to 13 glucose units, and a β -1,2-linked glucose backbone to which branches are attached by β -1,6 linkages. Methylation analysis indicated the presence of a small amount of β -1,3 linkages. Other methods did not confirm this fact, and we can assume that the formation of 4,6-di-*O*-methylglucose resulted from undermethylation of a small part of the molecules.

As with MDOs, these compounds are mainly found associated with the cell envelope and are probably localized within the periplasmic compartment of the bacterium. The small amount of glucans found in the culture media could be accounted for by moderate cell lysis. Periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* are found in larger amounts when the

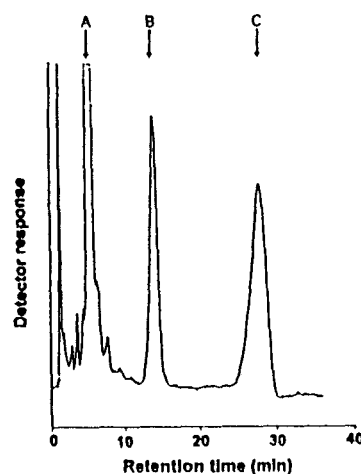


FIG. 5. HPAE analysis of the disaccharides obtained by partial acid hydrolysis of the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae*. A fraction of the partial hydrolysate was analyzed by HPAE as described in Materials and Methods. The arrows indicate the retention time for the following standards: A, glucose; B, gentiobiose (6-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucose); C, sophorose (2-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucose).

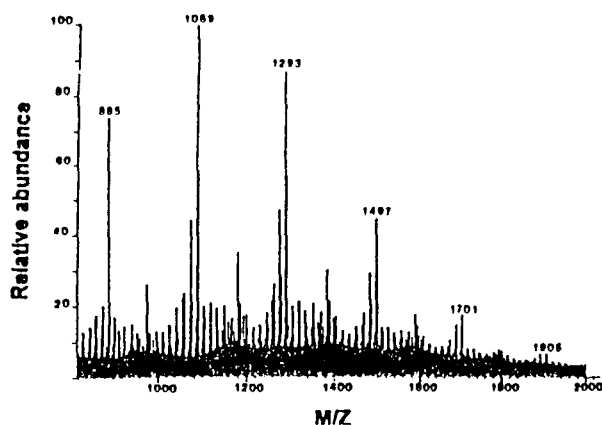


FIG. 6. Positive-ion fast atom bombardment MS of the highest-molecular-weight glucans produced by acetolysis of the periplasmic glucans of *P. syringae* pv. *syringae* as described in Materials and Methods. The mass spectra were recorded as described in Materials and Methods. The m/z values are recorded as the nominal masses of the sodium-cationized species $[M + Na]^+$.

osmolarity of the growth medium decreases. The ratios observed are very similar to those reported in the case of MDO biosynthesis in *E. coli* (12, 18).

MDOs were discovered by Van Golde et al. while measuring phospholipid turnover in *E. coli* (40). Further investigations revealed the highly anionic character of these oligosaccharides, and Kennedy (13) emphasized that these molecules with their net negative charge must contribute substantially to the Donnan equilibrium shown to be present across the outer membrane of *E. coli* (38). Thus, the increase in MDO content observed when the bacteria were grown in media of low osmolarity was interpreted as a mechanism for controlling the osmolarity of the periplasmic space (12). Besides their strong structural similarity to MDOs, the periplasmic glucans found in *P. syringae* pv. *syringae* are neutral in character. Thus, one may envisage either that different functions have evolved for those closely related compounds or that the neutral or charged character of these glucans does not play a part in a common function. This function, which cannot be directly related to the Donnan equilibrium, remains a mystery.

Since cyclic β -glucans are produced by bacteria of the family *Rhizobiaceae*, and because these bacteria are well known for their ability to infect higher plants, it is possible that the cyclic character of these compounds is specific for plant infection (23, 25). In other families of plant-interacting bacteria, emphasis has been put on extracellular carbohydrates (exopolysaccharides and lipopolysaccharides) as factors implicated in cell-cell surface interactions and signalling (see reference 19 for a recent short review). Thus, very few data are available concerning the periplasmic glucans of bacteria other than those already mentioned in this paper (1, 37). The present study and previous data (21) demonstrate that the pathogenicity and elicitation of the hypersensitive reaction by *P. syringae* pv. *syringae* are related to the osmotically regulated synthesis of MDO-like glucans in the periplasm of this bacterium. This observation supports the notion that these compounds are functional analogs of the cyclic glucans of the family *Rhizobiaceae*. The differences observed between the structures may be attributable to the phylogenetic positions of these organisms among proteobacteria rather than host specificity. Further

investigations of periplasmic glucans are aimed at improving our knowledge of the structural diversity of these compounds in relation to the phylogenetic position and ecology of the bacteria that produce them.

ACKNOWLEDGMENTS

Spectral data were provided by Yves Leroy and Guy Ricart for fast atom bombardment MS, Jean-Michel Wieruszcki for NMR, and Arnd Ingendoh (Münster University, Münster, Germany) for matrix-assisted UV-LD-MS. We are grateful to Anthony Corfield for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 111) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Amemura, A., and J. Cabrera-Crespo. 1986. Extracellular oligosaccharides and low- M_r polysaccharides containing (1 \rightarrow 2)- β -D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2443-2452.
- Anderson, D. M., and D. Mills. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 75:104-108.
- Batley, M., J. W. Redmond, S. P. Djordjevic, and B. G. Rolfe. 1987. Characterization of glycerophosphorylated cyclic β -1,2-glucans from a fast-growing *Rhizobium* species. *Biochim. Biophys. Acta* 901:119-126.
- Dell, A., W. S. York, M. McNeil, A. G. Darvill, and P. Albersheim. 1983. The cyclic structure of β -D-(1,2)-linked D-glucans secreted by *Rhizobia* and *Agrobacteria*. *Carbohydr. Res.* 117:185-200.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and P. Albersheim. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28:350-356.
- Dubourdeau, D., P. Ribereau-Gayon, and B. Fournet. 1981. Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* 93:294-299.
- Dylan, T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas, M. Yanofsky, E. Nester, D. R. Hellinski, and G. Ditta. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4403-4407.
- Fournet, B., G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil. 1981. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* 116:489-502.
- Geremia, R. A., S. Cavalgnac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form β -(1 \rightarrow 2) glucan. *J. Bacteriol.* 169:880-884.
- Hisamatsu, M. 1992. Cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* 231:137-146.
- Hisamatsu, M., T. Yamada, T. Higashilura, and M. Ikeda. 1987. The production of acidic, *o*-acylated cyclophorans [cyclic (1-2)- β -D-glucans] by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* 163:115-122.
- Kennedy, E. P. 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1092-1095.
- Kennedy, E. P. 1987. Membrane-derived oligosaccharides, p. 672-679. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kennedy, E. P., M. K. Rumley, H. Schulman, and L. M. G. Van Golde. 1976. Identification of *sn*-glycerol-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251:4208-4213.
- Kulrel, Y. A., A. S. Shashkov, N. A. Paramonov, G. M. Zdorovenko, L. P. Solyanik, and L. M. Yakovleva. 1993. Somatic antigens of pseudomonads: structure of the O-specific polysaccharide of

- Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 140(R). *Carbohydr. Res.* 243: 199-204.
16. Kolzumi, K., Y. Okada, S. Horiyama, and T. Utamura. 1983. Separation of cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclosophoraoses) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*, and determination of their degree of polymerisation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 265:89-96.
 17. Lacroix, J. M., I. Loubens, M. Tempête, B. Menichl, and J.-P. Bohlin. 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* 5:1745-1753.
 18. Lacroix, J.-M., M. Tempête, B. Menichl, and J.-P. Bohlin. 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.
 19. Long, S. R., and B. J. Staskawicz. 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell* 73:921-935.
 20. Loubens, I., L. Debarbieux, A. Bohlin, J.-M. Lacroix, and J.-P. Bohlin. 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hpmM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 10:329-340.
 21. Loubens, I., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohlin. 1993. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K12. Presented at the 8th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Versailles, France.
 22. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 23. Miller, K. J., and R. S. Gore. 1992. Cyclic β -1,6 -1,3 glucans of *Bradyrhizobium*: functional analogs of the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium*? *Curr. Microbiol.* 24:101-104.
 24. Miller, K. J., R. S. Gore, and A. J. Benesi. 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* 170:4569-4575.
 25. Miller, K. J., R. S. Gore, R. Johnson, A. J. Benesi, and V. N. Reinhold. 1990. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 172:136-142.
 26. Miller, K. J., E. P. Kennedy, and V. N. Reinhold. 1986. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231:48-51.
 27. Miller, K. J., V. N. Reinhold, A. C. Welssborn, and E. P. Kennedy. 1987. Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. *Biochim. Biophys. Acta* 901:112-118.
 28. Mills, D., and P. Mukhopadhyay. 1990. Organization of the *hpmM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis, p. 47-57. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas*: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 29. Mills, D., and F. Niepold. 1987. Molecular analysis of pathogenesis of *P. syringae* pv. *syringae*, p. 185-200. In S. Nishimura, C. P. Vance, and N. Doke (ed.), *Molecular determinants of plant diseases*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
 30. Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Splk, and G. Strecker. 1986. Glycoproteins, p. 143-204. In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate analysis: a practical approach*. IRL Press, Inc., Washington, D.C.
 31. Mukhopadhyay, P., J. Williams, and D. Mills. 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 170:5479-5488.
 32. Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, and G. Ricard. 1984. A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141:41-47.
 33. Rivanerajah, V., F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, and E. W. Nester. 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 164:102-106.
 34. Rollin, D. B., P. E. Pfeffer, S. F. Osman, B. S. Szwegold, F. Kappler, and A. J. Benesi. 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted β -1,6 -1,3 macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta* 1116:215-225.
 35. Rosenfeld, L., and C. E. Ballou. 1974. Acetolysis of disaccharides: comparative kinetics and mechanisms. *Carbohydr. Res.* 32:287-298.
 36. Schnelder, J. E., V. Reinhold, M. K. Rumley, and E. P. Kennedy. 1979. Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254:10135-10138.
 37. Schulman, H., and E. P. Kennedy. 1979. Localization of membrane-derived oligosaccharides in the outer membrane of *Escherichia coli* and their occurrence in other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 137:686-688.
 38. Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman. 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252:7850-7861.
 39. Usul, T., N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama, and S. Seto. 1973. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1:2425-2432.
 40. Van Golde, L. M. G., H. Schulman, and E. P. Kennedy. 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1368-1372.
 41. Willis, D. K., J. J. Rich, and E. M. Hrabak. 1991. *hpm* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 4:132-138.
 42. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

III) Vers une analyse systématique des OPG

Les études structurales des OPG d'*E. coli*, avant la réalisation de ce travail, ont été effectuées sur des glucanes extraits de bactéries cultivées dans des conditions physiologiques mal contrôlées et seulement sur des sous-fractions de ces glucanes résultant d'une chromatographie sur DEAE-cellulose, puis sur Dowex-1-acétate pH 3,7. Par exemple, Schneider et coll. (1979) ont effectué leurs études sur des OPG extraits de plus de 20 litres de culture d'*E. coli* en fermenteur dans un milieu riche. Comme on ne connaît pas qu'elles peuvent être les variations de taille et de substitution des OPG en fonction des conditions de culture, il était nécessaire de mettre au point des méthodes d'analyse sur la totalité des OPG isolés de cultures bien contrôlées effectuées dans de petits volumes.

Cette mise au point a été basée sur l'étude des OPG synthétisés par une souche de type sauvage et une souche *mdoB* d'*E. coli*. Un mutant *mdoB* est incapable de catalyser le transfert des résidus de phosphoglycérol sur le squelette glucosidique des OPG (voir introduction). Les résultats concernant l'analyse des substituants ont été obtenus principalement grâce à l'emploi de méthodes enzymologiques et chimiques, et l'étude de l'influence de la substitution sur la structure du squelette glucidique n'avait jamais été entreprise. Seul les travaux de Fiedler et Rotering (1985) sur un mutant *mdoB* montrent que le niveau de substitution sur les OPG d'*E. coli* par la phosphoéthanolamine semble plus élevé lorsque la substitution par les résidus de *sn*-1-phosphoglycérol est abolie. Ces méthodes ont été appliquées aux OPG synthétisés par *E. chrysanthemi*, entérobactérie qui provoque la pourriture molle de nombreuses plantes, aussi bien monocotylédones que dicotylédones. La virulence de cette bactérie est liée à la sécrétion de nombreuses enzymes bien étudiées, en particulier pectinolytiques, mais il n'existait pas de données concernant les OPG. Cette entérobactérie est très proche d'*E. coli* et elle fait partie, comme *E. coli* et *P. syringae*, de la subdivision gamma des protéobactéries. Cette classification a été élaborée en comparant les séquences des ARN ribosomiques 16S. Les protéobactéries, encore appelées bactéries pourpres, peuvent être divisées en cinq subdivisions : alpha, bêta, gamma, delta et epsilon (Olsen et coll., 1994).

Les méthodes de spectrométrie de masse tels que FAB-MS, MALDI-MS et GC-MS ont été appliquées sur ces différents OPG. Ces études ont été complétées par l'analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions. De plus, les OPG sont soumis à une régulation dépendant de l'osmolarité du milieu de culture des bactéries. Nous avons donc étudié

plus précisément l'effet de l'osmolarité du milieu de culture sur la structure des OPG d'*E. chrysanthemi*.

Ce travail a été réalisé en collaboration étroite avec Bernd Stahl qui préparait sa thèse dans le groupe de Franz Hillenkamp de l'université de Münster en Allemagne.

A) Analyse des OPG d'*E. coli* par spectrométrie de masse

Les OPG d'*E. coli* ont été extraits par la méthode à l'éthanol à partir de souches cultivées jusqu'en phase stationnaire dans un milieu de faible osmolarité. Pour l'analyse en MALDI-MS des OPG d'*E. coli*, différentes matrices ont été utilisées. Pour l'analyse des OPG natifs, la 3-aminoquinoline (Stahl et coll., 1994 ; AQU) a été utilisée comme matrice en mode négatif. La figure 18 présentent les résultats obtenus pour les OPG synthétisés par une souche d'*E. coli* de type sauvage (figure 18a) et *mdoB* (figure 18b). Par comparaison, la figure 19 montre le spectre obtenu par FAB-MS en mode négatif pour les OPG synthétisés par une souche de type sauvage d'*E. coli*. Le squelette glucosidique de ces OPG, obtenu après traitements alcalin et à l'acide fluorhydrique aqueux, a été analysé par MALDI-MS en mode positif en utilisant l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (DHB ; Stahl et coll., 1991 ; Mock et coll, 1991) comme matrice (figures 20a et 20b pour les OPG synthétisés respectivement par les souches de type sauvage et *mdoB*). Les glucanes neutres sont détectés préférentiellement sous la forme des ions moléculaires $[M + Na]^+$. La taille du squelette glucosidique des OPG synthétisés par les deux souches varie dans les mêmes proportions (de 5 à 12 résidus de glucose par molécule, l'espèce majoritaire observée contenant 8 résidus $[M + Na]^+ = 1337,4$). La composition des différentes molécules natives d'OPG peut être calculée en fonction des masses observées dans les différents spectres (tableaux 4 et 5). On constate que l'espèce majoritaire produite par la souche de type sauvage d'*E. coli* est composée, d'après l'analyse par MALDI-MS, de 8 résidus de glucose, 2 résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, et un résidu de succinate ($[M - H]^- = 1721$). La meilleure résolution obtenue lors de l'analyse par FAB-MS permet de déterminer la présence de molécules qui sont moins abondantes lors de l'analyse par MALDI-MS. Toutefois, la présence de nombreuses fragmentations lors de l'analyse par FAB-MS rend difficile la détermination de la quantité relative de chacune des molécules composant les OPG.

L'absence de l'activité phosphoglycérol-transférase I n'entraîne pas de différences dans la distribution en taille du squelette glucosidique (figures 20a et 20b). Par contre, la quantité de phosphoéthanolamine transférée est nettement augmentée (tableau 5), alors qu'apparemment, le transfert des résidus de succinate n'est pas modifié.

B) Analyse des OPG d'*E. chrysanthemi* par spectrométrie de masse

Les OPG d'*E. chrysanthemi* ont été extraits par la méthode à l'éthanol à partir de bactéries cultivées jusqu'en phase stationnaire dans un milieu de faible osmolarité. La figure 21a illustre l'analyse des OPG d'*E. chrysanthemi* par MALDI-MS en mode positif (matrice DHB). Ces OPG sont linéaires, et l'hétérogénéité en taille du squelette glucosidique varie, comme celle du MDO d'*E. coli*, de 5 à 12 résidus de glucose par molécule, avec l'espèce majoritaire observée contenant 8 résidus ($[M + Na]^+ = 1337,5$). Avec une faible abondance, la substitution par un résidu de succinate peut être aisément montrée sur la figure 21b. Cette figure est obtenue par une augmentation de l'échelle d'intensité de la figure 21a par un facteur de 20. En effet, on constate la présence d'ions moléculaires $[M + Na]^+$ possédant une masse incrémentée de 100 par rapport à celle des glucanes non substitués. Par exemple, l'ion moléculaire de masse $[M + Na]^+ = 1437,5$ correspond à celle d'un glucane linéaire constitué de 8 résidus de glucose et substitué par un résidu de succinate. Par comparaison, la figure 21c montre l'analyse par FAB-MS de ces OPG en mode négatif. La distribution en taille obtenue est différente car le glucane majoritaire observée contient alors 7 résidus de glucose par molécule ($[M - H]^- = 1151,4$) et l'hétérogénéité en taille varie de 5 à 10 résidus. Ceci peut s'expliquer par les fragmentations qui apparaissent lors des analyses en ce mode (notamment, la présence d'ions de fragmentations $[M - 120 - H]^-$ est clairement visible). De plus, l'analyse en mode FAB-MS semble indiquer que le taux de substitution par les résidus de succinate est plus grand. Ceci peut être dû à une meilleure ionisation de ces molécules chargés lors de l'analyse.

C) Analyse des OPG par HPAEC

Préalablement à l'analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions, les OPG d'*E. chrysanthemi* ont subi un traitement alcalin et les OPG d'*E. coli* ont été traités par l'acide fluorhydrique aqueux, suivi d'un traitement alcalin. Dans tous les cas, l'analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions pour les OPG d'*E. chrysanthemi* (figure 22a), d'*E. coli* de type sauvage (figure 22b) et *mdoB* (figure 22c) indique la présence d'un nombre de pics supérieur à l'hétérogénéité en taille observée lors de l'analyse par MALDI-MS et par FAB-MS.

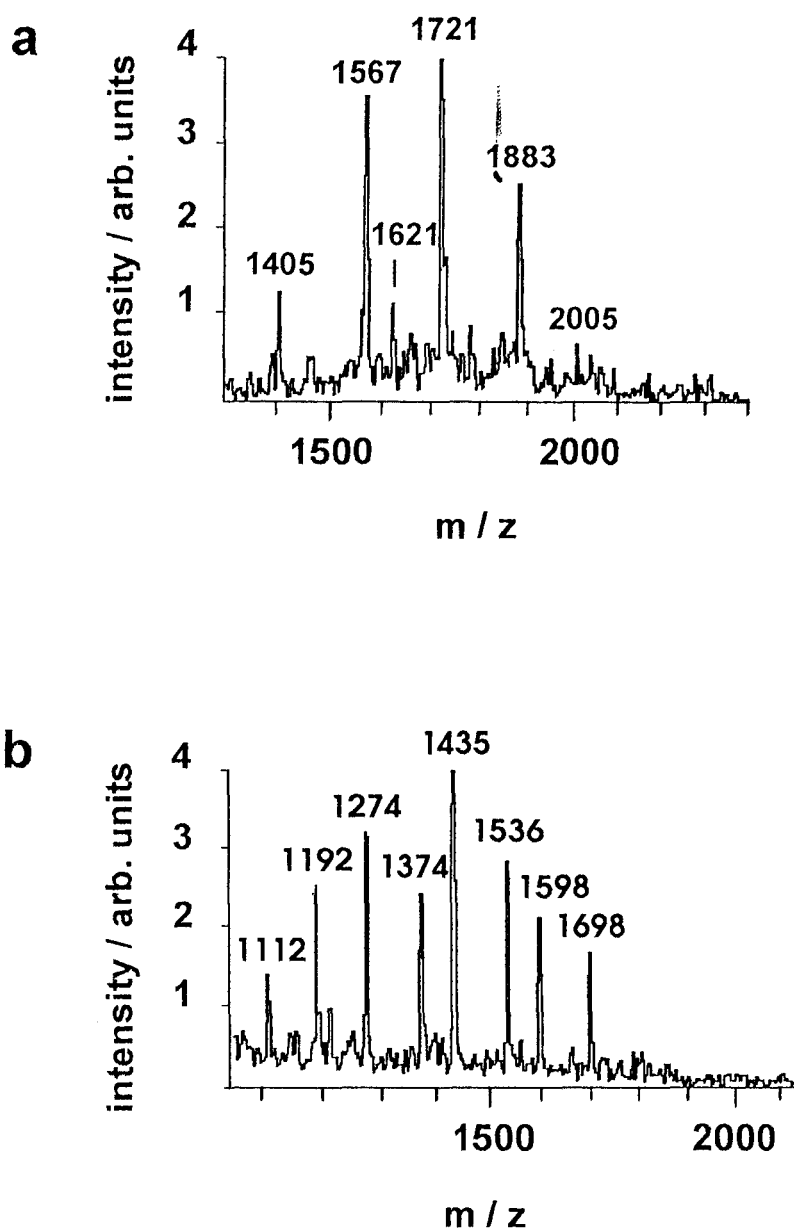


Figure 18 : spectres de masse MALDI obtenus en mode négatif (matrice AQU) des OPG synthétisés par (a) *E. coli* de type sauvage et (b) *E. coli mdoB*.

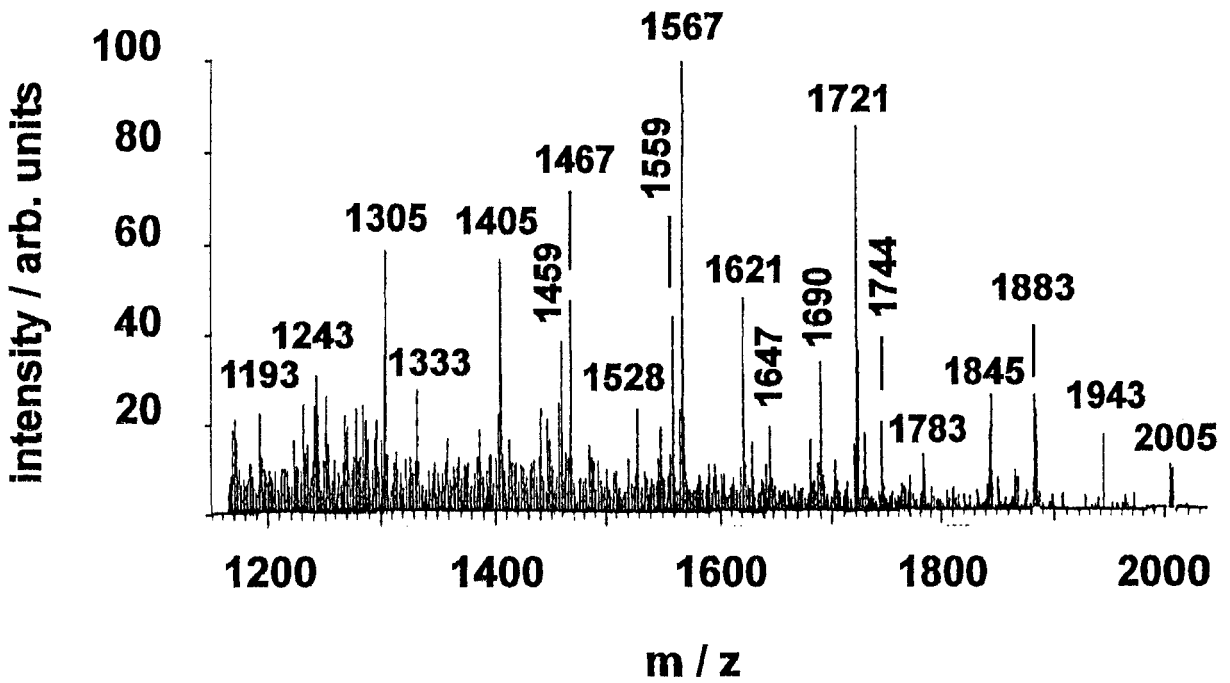


Figure 19 : spectre de masse FAB obtenu en mode négatif des OPG synthétisés par une souche de type sauvage d'*E. coli*.

Masses mesurées (M-H) ⁻	Composition				Masses calculées (M-H) ⁻
	Glucose	PG	SU	PE	
1193			ND		
1243	6	1	1	-	1243
1305	7	1	-	-	1305
1333			ND		
1405	7	1	1	-	1405
1459	7	2	-	-	1459
1467	8	1	-	-	1467
1528	7	1	1	1	1528
1559	7	2	1	-	1559
1567	8	1	1	-	1567
1621	8	2	-	-	1621
1647			ND		
1690	8	1	1	1	1690
1721	8	2	1	-	1721
1744	8	2	-	1	1744
1783	9	2	-	-	1783
1845	8	2	1	1	1844
1883	9	2	1	-	1883
1943	10	2	-	-	1945
2005	9	2	1	1	2006

Les masses moléculaires indiquées dans ce tableau dérivent de l'analyse par FAB-MS. PG, phosphoglycérol ; SU, acide succinique ; PE, phosphoéthanolamine ; ND, non déterminée ; -, non présent.

Tableau 4 : composition des OPG synthétisés par une souche de type sauvage d'*E. coli*.

Masses mesurées (M-H) ⁻	Composition				Masses calculées (M-H) ⁻
	Glucose	PG	SU	PE	
1112	6	-	-	1	1112
1192			ND		
1274	7	-	-	1	1274
1374	7	-	1	1	1374
1435	8	-	-	1	1436
1536	8	-	1	1	1536
1598	9	-	-	1	1598
1698	9	-	1	1	1698

Les masses moléculaires indiquées dans ce tableau dérivent de l'analyse par MALDI-MS. PG, phosphoglycérol ; SU, acide succinique ; PE, phosphoéthanolamine ; ND, non déterminée ; -, non présent.

Tableau 5 : composition des OPG synthétisés par une souche *mdoB* d'*E. coli*.

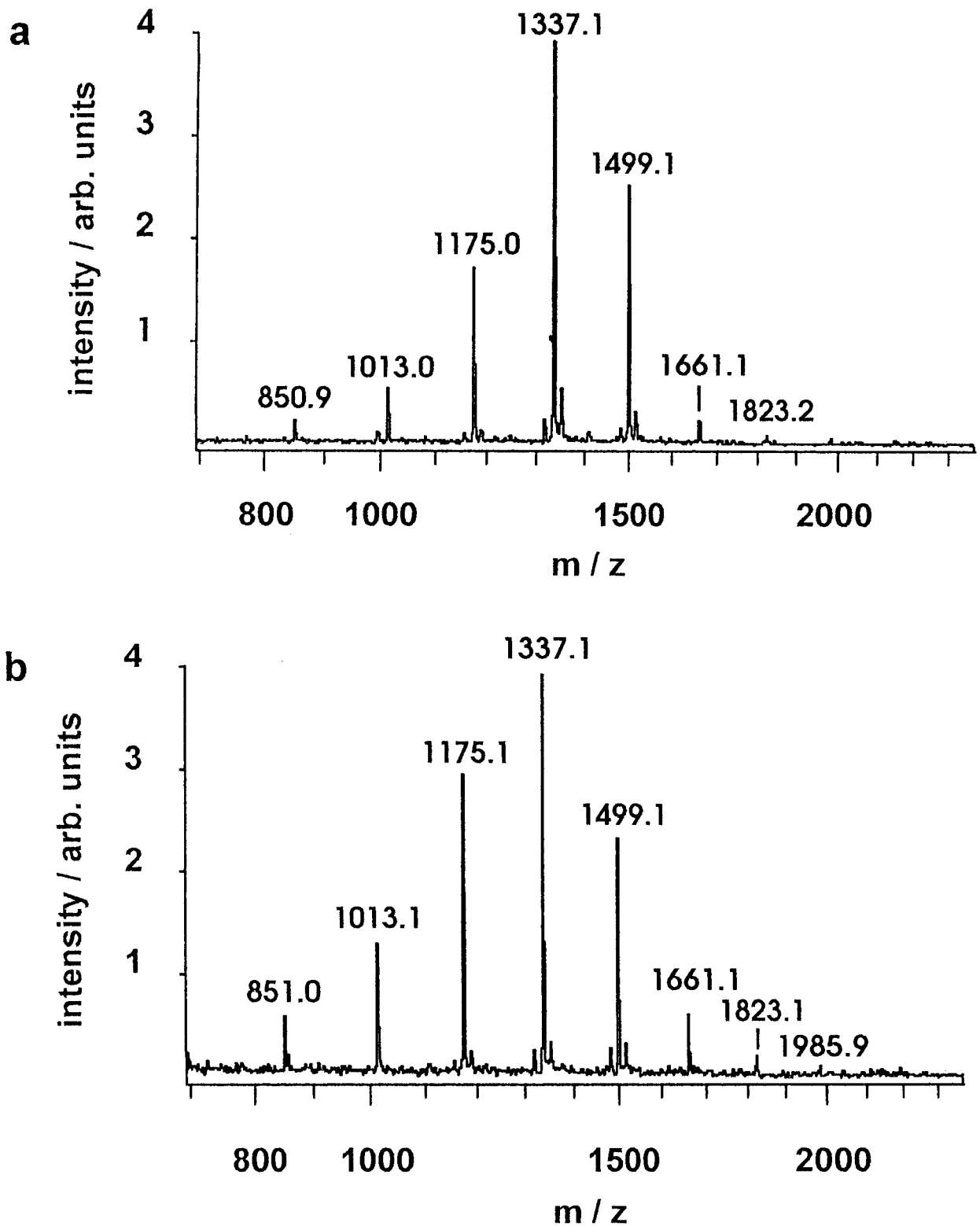


Figure 20 : spectres de masse MALDI obtenus en mode positif des OPG désubstitués synthétisés par (a) *E. coli* de type sauvage et (b) *E. coli mdoB*.

Afin de mieux comprendre ce phénomène, chacun des pics obtenus lors de l'analyse des OPG d'*E. chrysanthemi* a été collecté et dessalé. Dix fractions ont été ainsi obtenues (fractions 1 à 10 ; figure 22a) et analysées par spectrométrie de masse en mode MALDI-MS. Ces analyses montrent (tableau 6) la présence de glucanes possédant la même distribution en taille que décrite précédemment (5 à 12 résidus de glucose par molécule) et indiquent clairement que le temps de rétention de chacun des glucanes augmente avec le degré de polymérisation. De plus, lors de la séparation par HPAEC-PAD, plusieurs glucanes possédant des temps de rétention différents ont le même degré de polymérisation. En effet, les fractions 3 et 4 sont composés d'OPG ayant 7 résidus de glucose par molécule (figures 23a et 23b), et les fractions 5 et 6 sont composés d'OPG ayant 8 résidus de glucose par molécule (figures 23c et 23d). La présence de signaux moins intenses durant l'analyse peut provenir de contamination lors de la collecte ou de la présence de molécules possédant un degré de polymérisation différent, mais possédant des temps de rétention voisins. Les analyses par méthylation effectués sur les fractions 3, 4, 5, et 6 révèlent clairement que les OPG de la fraction 3 possèdent un nombre de points de branchement en β -1,6 plus important que ceux de la fraction 4 (tableau 7). Le même phénomène se produit pour les OPG des fractions 5 et 6 (tableau 7). Ces résultats indiquent que pour des OPG possédant le même degré de polymérisation, le temps de rétention diminue quand le taux de branchement en β -1,6 augmente. Les liaisons α -1,6 provoquent le même phénomène sur les temps de rétention lorsque l'on analyse des oligosaccharides branchés issus de l'amidon (Ammeraal et coll., 1991). De plus, ces analyses montrent clairement que les OPG d'*E. chrysanthemi* possèdent un squelette glucosidique très proche de celui des OPG d'*E. coli*. En partant du postulat que les OPG possédant le même temps de rétention ont globalement la même structure, il est possible de comparer, pour les pics les plus importants, la distribution semi-quantitative obtenue par l'analyse en MALDI-MS avec celle obtenue par HPAEC-PAD (tableau 8). Ces résultats ont été obtenus en mesurant les surfaces des pics obtenus lors de l'analyse par HPAEC-PAD pour les degrés de polymérisation les plus importants (7, 8, et 9), et en les comparant avec celles obtenues lors de l'analyse par MALDI-MS. On constate alors que l'ensemble de ces informations est en accord (table 8). L'analyse par MALDI-MS peut donc être considérée, en combinaison avec l'analyse par HPAEC-PAD, comme une bonne méthode d'analyse semi-quantitative pour ces glucanes linéaires et branchés.

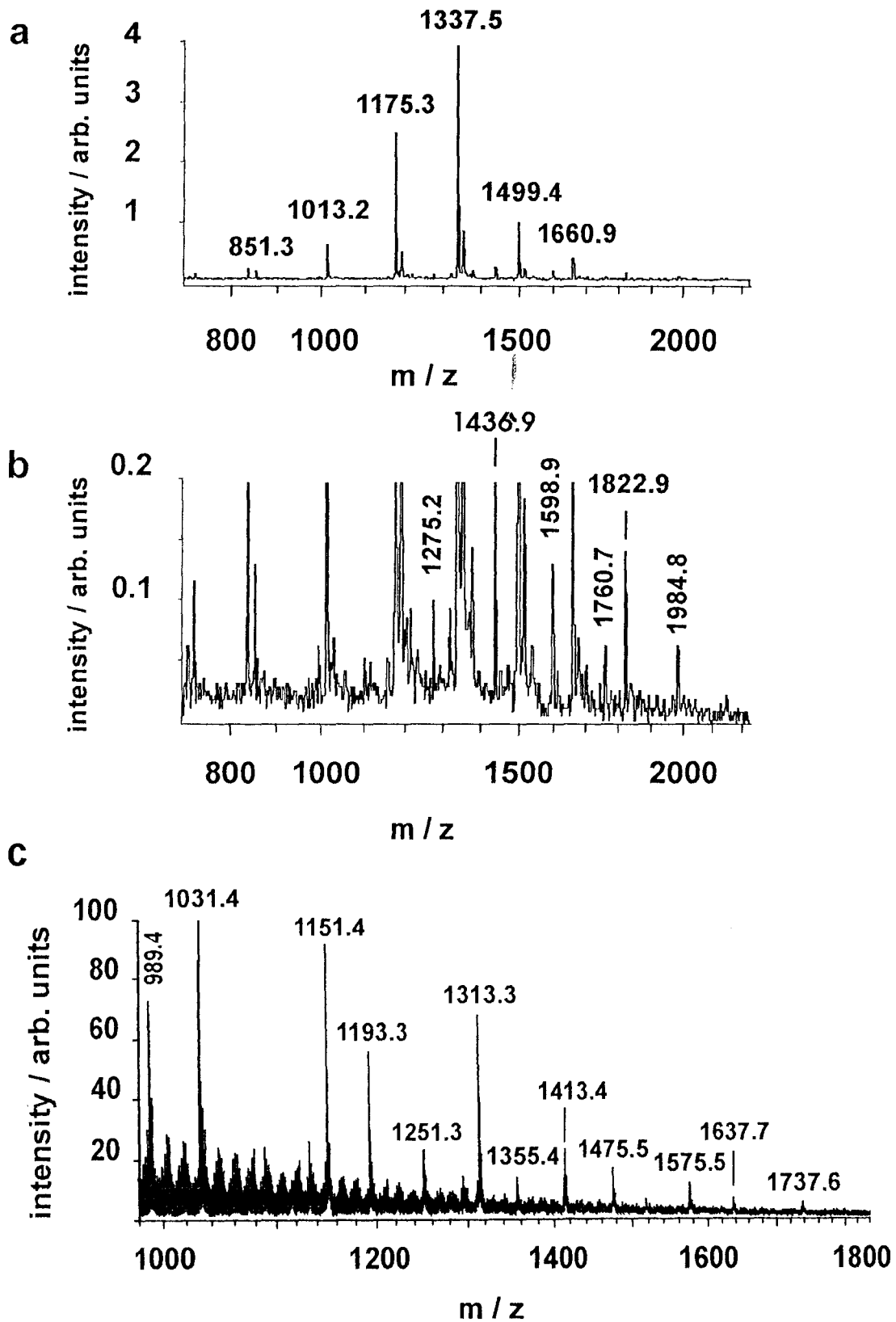


Figure 21 : spectres de masse des OPG synthétisés par *E. chrysanthemi*.

(a) Spectre MALDI en mode positif (b) extension de l'échelle d'intensité du spectre a par un facteur de 20 (c) spectre FAB en mode négatif.

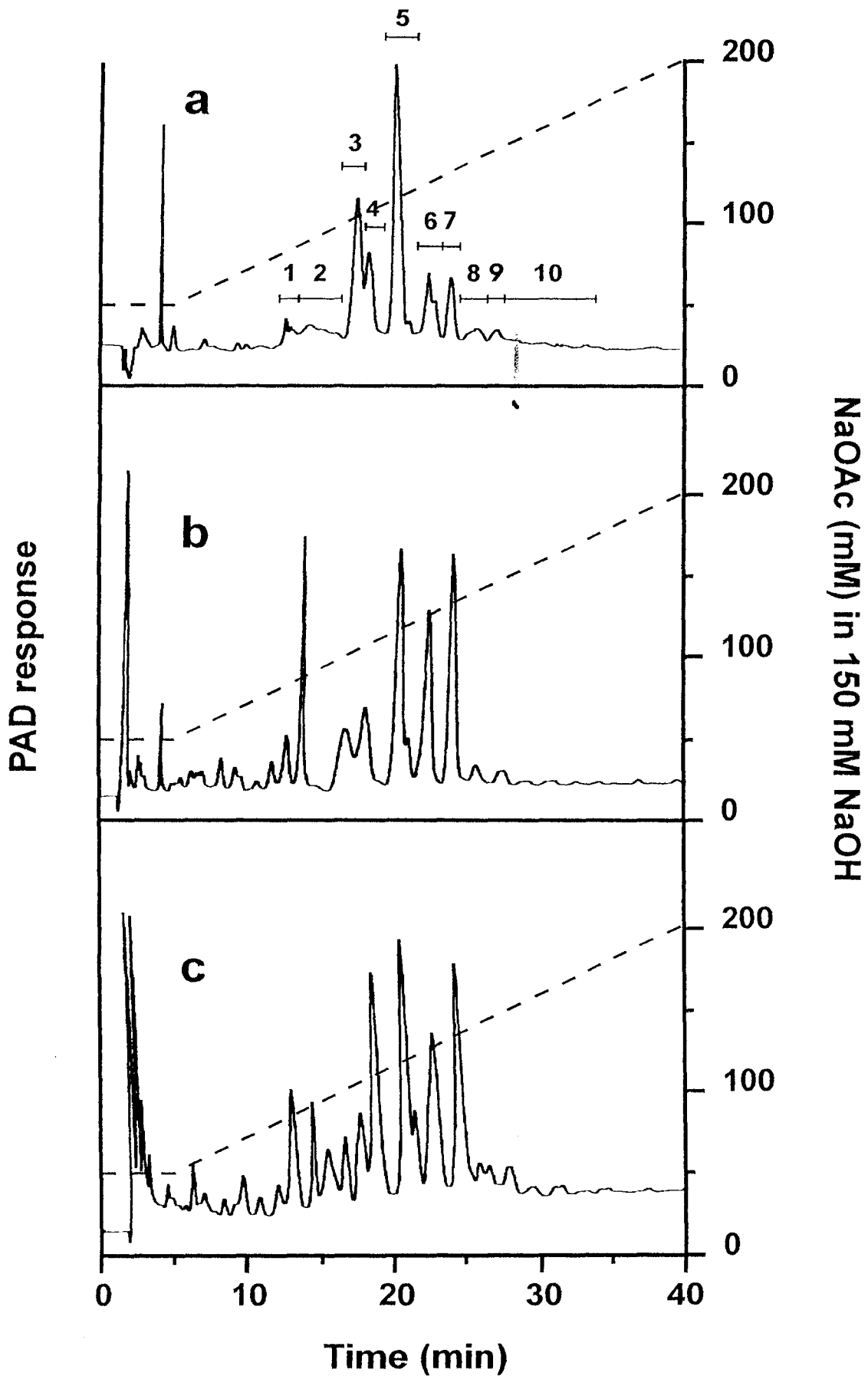


Figure 22 : chromatographies à haute performance d'échanges d'anions à haut pH des OPG synthétisés par (a) *E. chrysanthemi* (b) *E. coli* de type sauvage et (c) *E. coli mdoB*.

numéros de fraction	Masses mesurées (M+Na) ⁺	Degré de polymérisation calculé
1	851.6	5
2	1013.8	6
3	1175.3	7
4	1175.3	7
5	1337.4	8
6	1337.5	8
7	1499.6	9
8	1499.9	9
9	1662.3	10
10	1824.4, 1986.6	11, 12

Les masses moléculaires indiquées dans ce tableau dérivent des signaux les plus intenses obtenus lors de l'analyse par MALDI-MS.

Tableau 6 : analyses par MALDI en mode positif des fractions 1 à 10 obtenues après fractionnement par HPAEC-PAD.

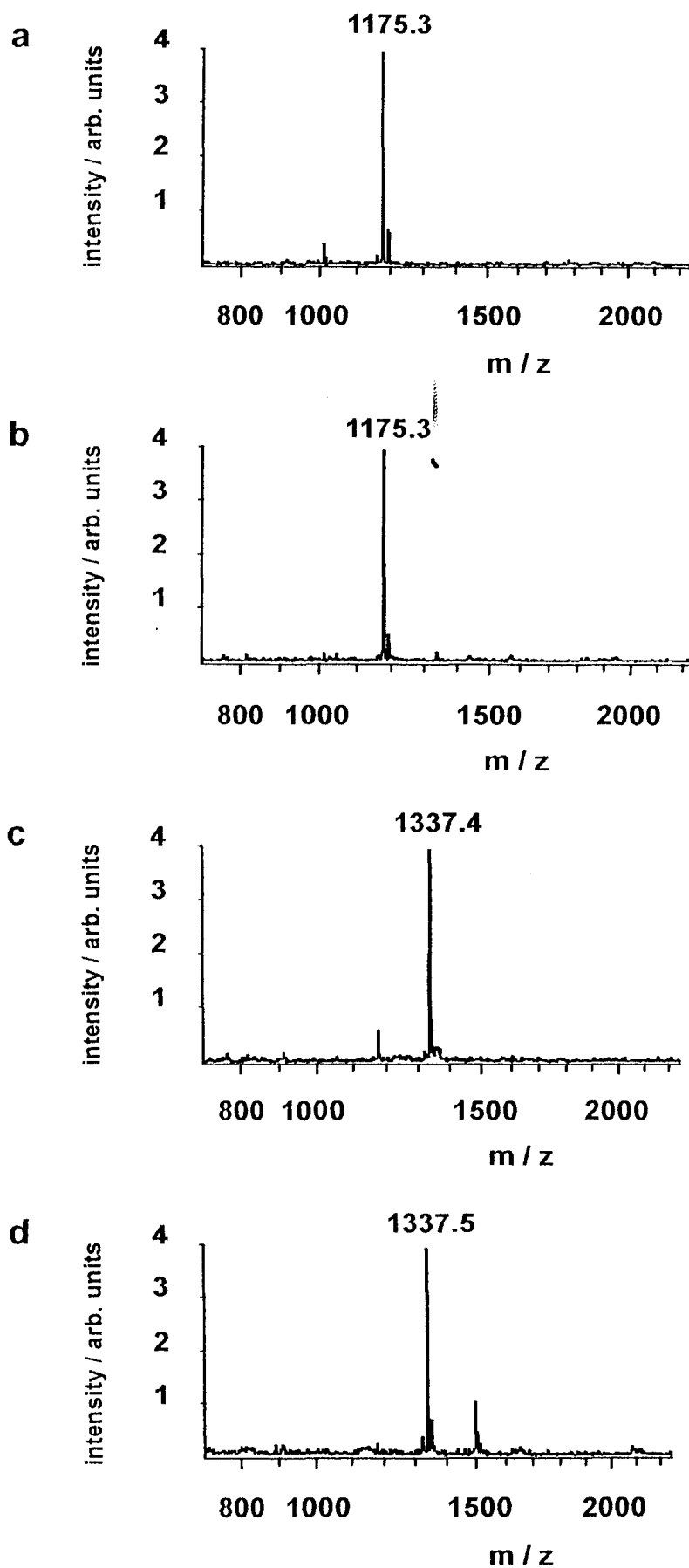


Figure 23 : spectre de masse MALDI en mode positif des fractions 3 (a), 4 (b), 5 (c) et 6 (d).

Ethers méthyliques				
% ; (rapports molaires)				
Numéros de fraction	Glc terminal (2,3,4,6-Glc)	Glc lié en 2 (3,4,6-Glc)	Glc lié en 6 (2,3,4-Glc)	Glc lié en 2 et 6 (3,4-Glc)
3	35 (2.4)	32 (2.2)	7 (0.5)	26 (1.9)
4	25 (1.8)	55 (3.8)	3 (0.2)	17 (1.2)
5	31 (2.5)	27 (2.2)	10 (0.8)	32 (2.5)
6	31 (2.5)	44 (3.5)[^]	5 (0.4)	20 (1.6)

Les quantités indiquées dans ce tableau dérivent de la surface des pics des différents chromatogrammes en phase gazeuse. 2,3,4,6-Glc = 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-glucose. Les rapports molaires sont basés sur le degré de polymérisation observé lors de l'analyse par MALDI-MS de chaque fraction.

Tableau 7 : analyse par méthylation des fractions 3, 4, 5 et 6.

OPG synthétisés par :	Degré de polymérisation	MALDI	HPAE
<i>E. chrysanthemi</i>	7	69	65
	8	100	100
	9	18	24
<i>E. coli</i> (souche de type sauvage)	7	46	41
	8	100	100
	9	64	61
<i>E. coli</i> (souche <i>mdoB</i>)	7	75	78
	8	100	100
	9	58	60

Tableau 8 : comparaison des surfaces des pics obtenus lors des analyses par MALDI-MS et HPAEC-PAD.

Nous sommes donc en accord avec Koizumi et coll (1988) qui ont démontré que chacun des glucanes cycliques liés en β -1,2 possèdent la même réponse PAD et avec Garozzo et coll. (1994) qui ont récemment montré que l'analyse par MALDI-MS est une méthode semi-quantitative pour la détermination de la distribution en taille des glucane cycliques liés en β -1,2.

D) Etude de la régulation des OPG d'*E. chrysanthemi*.

Les OPG sont soumis à une régulation dépendant de l'osmolarité du milieu de culture des bactéries. Nous avons donc étudié plus précisément l'effet de l'osmolarité du milieu de culture sur la structure des OPG d'*E. chrysanthemi*.

1) Purification et analyse par tamisage moléculaire

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire et les OPG ont été extraits par la méthode à l'acide trichloroacétique. La figure 24 illustre la chromatographie de tamisage moléculaire des extraits obtenus. Quand *E. chrysanthemi* est cultivée dans un milieu de faible osmolarité, avec ou sans ajout de NaCl (0,3 M), la quantité d'OPG synthétisée diminue (figure 24). En effet, cette quantité est de 18 μ g de glucose / mg de protéines pour le milieu contenant 0,3 M NaCl (contre 76 pour le milieu sans ajout), ce qui correspond à une diminution de synthèse d'un facteur 4,2.

2) Analyse par MALDI-MS et par RMN

L'analyse des OPG d'*E. chrysanthemi* synthétisés dans un milieu de faible osmolarité avec addition de NaCl par MALDI-MS (figure 25) montre clairement que la distribution en taille du squelette glucosidique n'est pas modifiée. En effet, le glucane majeur observé contient 8 résidus de glucose par molécule ($[M + Na]^+ = 1337,3$). Toutefois, on observe la présence d'ions moléculaires correspondant à la présence de glucanes substitués par plusieurs résidus de succinate par molécule. Par exemple, les ions moléculaires $[M + Na]^+$ de masse 1437,3, 1537,6 et 1637,5 correspondent à des glucanes possédant huit résidus de glucose et substitués respectivement par 1, 2, et 3 résidus de succinate par molécule. La présence de glucanes possédant plusieurs résidus de succinate par molécule n'ayant jamais été révélée chez les OPG d'*E. chrysanthemi* cultivée dans le milieu de faible osmolarité (figure 21b), on peut penser que la substitution par les résidus de succinate est dépendante de l'osmolarité du milieu de croissance.

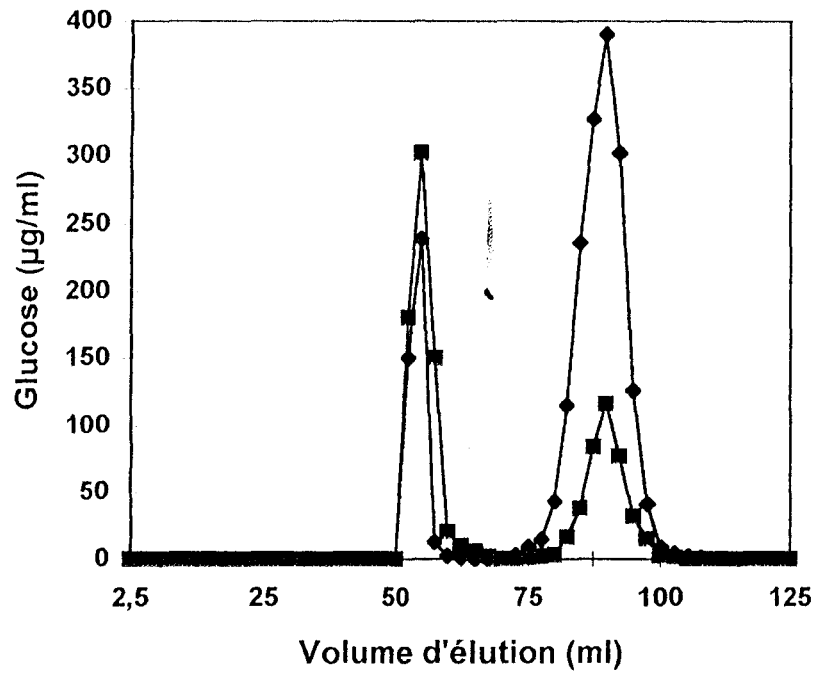


Figure 24 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 des OPG synthétisés par *E. chrysanthemi* cultivée dans un milieu de basse osmolarité (◆) et dans le même milieu contenant 0,3 M NaCl (■).

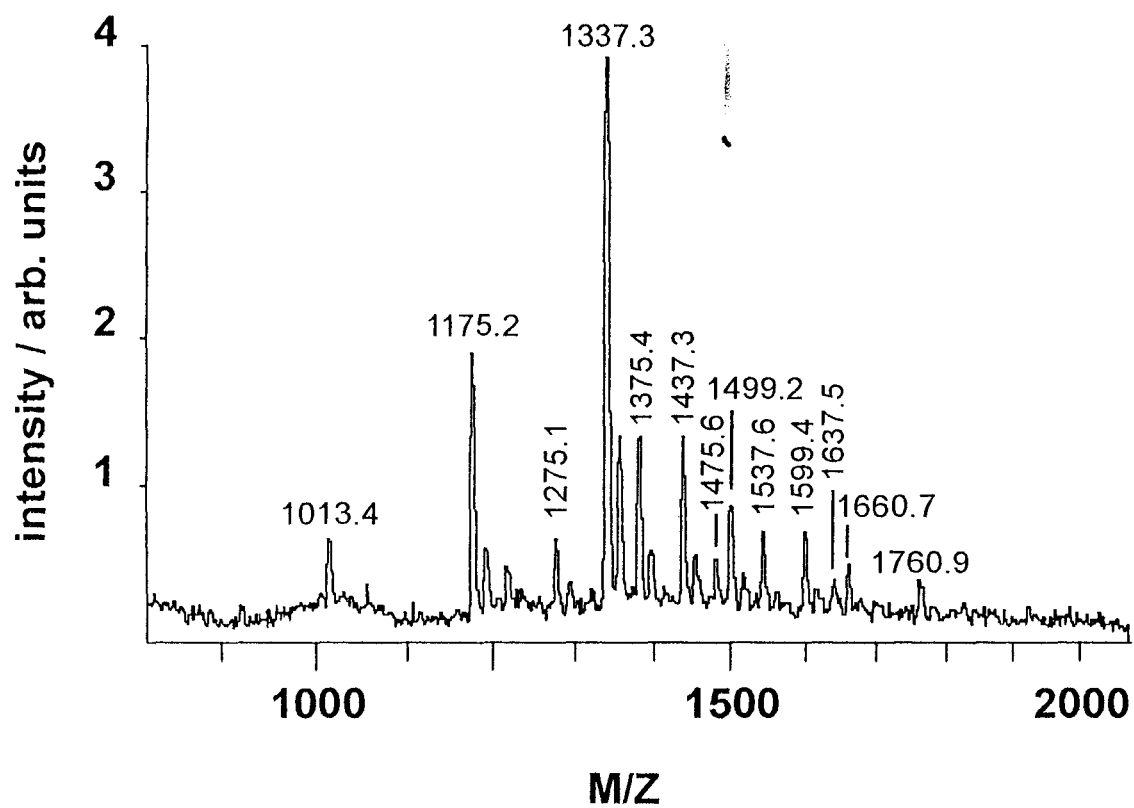


Figure 25 : spectre MALDI en mode positif des OPG synthétisés par *E. chrysanthemi* cultivée dans un milieu de faible osmolarité contenant 0,3 M NaCl.

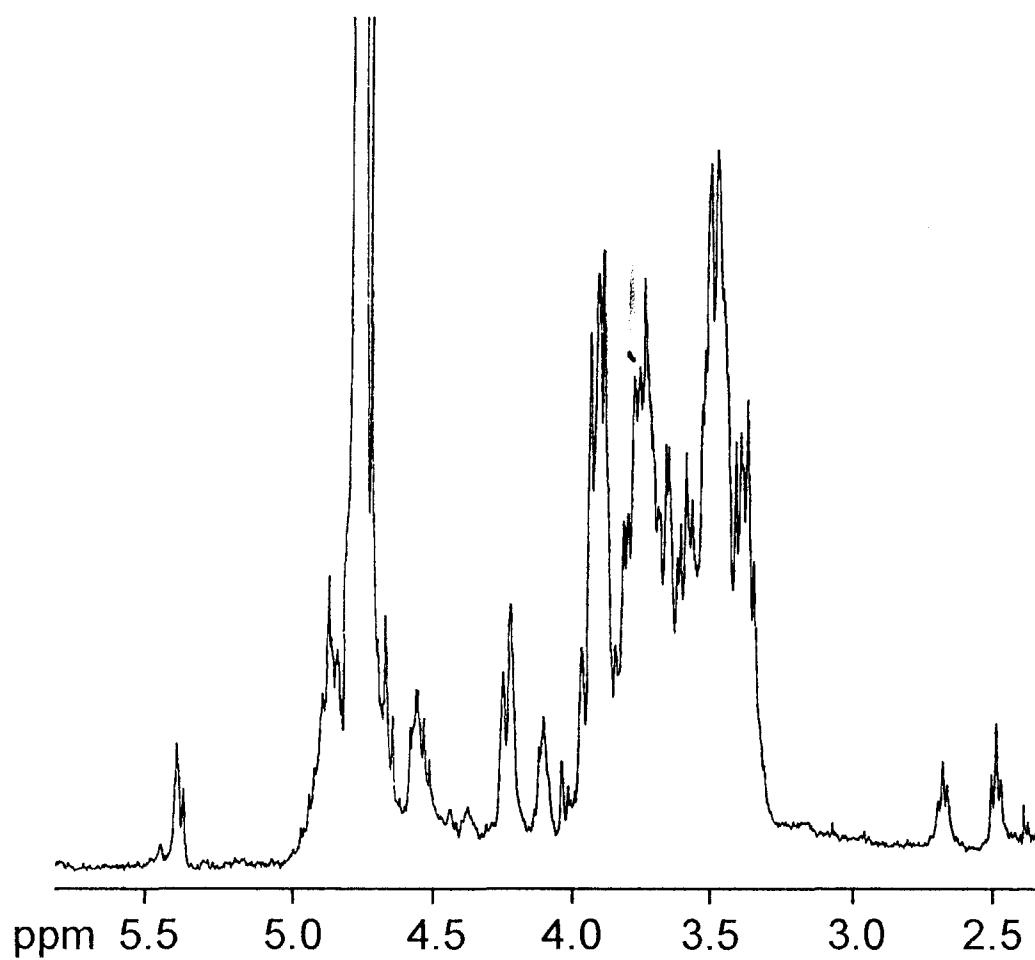


Figure 26 : spectre RMN du proton à 400 MHz des OPG synthétisés par *E. chrysanthemi* cultivée dans un milieu de faible osmolarité contenant 0,3 M NaCl.

Cette régulation de la substitution est de plus confirmée par l'analyse par RMN du ^1H à 400 MHz du proton (figure 26). En effet, l'intensité des signaux à approximativement 2,45 et 2,60 ppm, correspondant à ceux des CH_2 composant les résidus de succinate, est augmenté par rapport à celle observée lors de cette même analyse pour les OPG extraits d'*E. chrysanthemi* cultivée dans un milieu de faible osmolarité sans ajout de NaCl (figure 29b). Toutefois, cette augmentation de transfert des résidus de succinate peut correspondre à un effet de l'augmentation de la force ionique, et non à un effet de l'augmentation de l'osmolarité. Pour pouvoir trancher entre ces deux hypothèses, il faudra effectuer les mêmes expériences en présence d'agents osmolites neutres, tels que le mannitol ou le saccharose par exemple.

E) Conclusion

Les OPG extraits de 100 à 200 ml de culture suffisent maintenant pour réaliser toutes les analyses décrites dans cette partie de mon travail. Ceci représente un progrès considérable et va permettre d'étudier avec précision l'influence des conditions de culture des bactéries sur la structure des OPG synthétisés. En effet, comme le montre l'analyse des OPG d'*E. chrysanthemi*, l'osmolarité du milieu de culture peut changer le taux de substitution par les résidus de succinate. Il conviendra d'effectuer cette même étude sur les OPG d'*E. coli*, ceci afin de voir si l'on observe le même phénomène, non seulement pour les résidus de succinate, mais également pour les autres substituants.

De plus, l'analyse par MALDI-MS semble la plus appropriée pour la détermination de l'hétérogénéité en taille du squelette glucosidique des OPG. L'analyse par HPAEC-PAD est complémentaire, car elle permet non seulement la séparation des glucanes en fonction de leur degré de polymérisation, mais également en fonction du taux de branchement par les liaisons β -1,6.

L'analyse des OPG natifs d'*E. coli* est fortement compliquée par la présence de nombreux groupements anioniques. Toutefois, l'analyse par MALDI-MS en mode négatif (matrice AQU) donne de bons résultats. L'utilisation de cette matrice a permis d'obtenir des spectres de bonnes résolutions, contrairement au DHB, matrice la plus utilisée pour les oligosaccharides mais qui donne des résultats très peu satisfaisants pour les oligosaccharides chargés (Stahl et coll., 1994). L'analyse par FAB-MS donne de nombreuses fragmentations, qui bien qu'étant très utiles pour la détermination de structures complexes d'oligosaccharides, ne permettent pas la détermination de la distribution en taille des molécules d'OPG.

IV) *E. coli*, *E. chrysanthemi*, et *P. syringae* synthétisent une même famille d'OPG

Les nouvelles méthodes d'investigation structurale des oligosaccharides utilisées montrent clairement qu'*E. coli*, qu'*E. chrysanthemi*, et que *P. syringae* de type sauvage synthétisent une famille commune d'OPG linéaires et branchés. La différence majeure étant la présence ou l'absence de substituants. Il convenait toutefois de bien les comparer, notamment par l'utilisation des analyses par RMN du ^1H et ^{13}C .

A) Comparaison de la quantité d'OPG synthétisés

Les bactéries ont été cultivées, dans tous les cas, jusqu'en phase stationnaire dans un milieu de faible osmolarité, et les OPG ont été extraits par la méthode à l'éthanol. Le tableau 9 montre que le niveau de synthèse des OPG diffère d'une souche à l'autre. En effet, *E. chrysanthemi* synthétise approximativement deux fois plus d'OPG qu'*E. coli*. Ce niveau de synthèse semble similaire à celui observé chez *B. japonicum* (70 μg de glucose / mg de protéines ; Miller et coll., 1990), mais inférieur à celui de *R. meliloti* (200 μg de glucose / mg de protéines ; Breedveld et coll., 1995a).

Souche	Quantité d'OPG synthétisés (μg de glucose / mg de protéines)
<i>E. coli</i> JM101	30
<i>E. chrysanthemi</i> 3937	70
<i>P. syringae</i> R32	55

Tableau 9 : comparaison des quantités d'OPG produits par *E. coli*, *E. chrysanthemi*, et *P. syringae*.

B) Comparaison du squelette glucidique

1) Analyse par méthylation

Les résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus après perméthylation et méthanolyse des OPG produits par les souches d'*E. coli*, *E. chrysanthemi* et *P. syringae* sont illustrés dans le tableau 10.

Ethers méthyliques	Quantité détectée pour les souches		
	<i>E. coli</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>P. syringae</i>
Glucose terminal (2,3,4,6-tétra-O-méthylglucose)	1,0	1,1	1,0
Glucose lié en 2 (3,4,6-tri-O-méthylglucose)	2,4	1,9	1,0
Glucose lié en 6 (2,3,4-tri-O-méthylglucose)	0,2	0,2	0,1
Glucose lié en 2 et 6 (3,4-di-O-méthylglucose)	1,0	1,0	1,0
Glucose lié en 2 et en 3 (4,6-di-O-méthylglucose)	0,1	0,1	0,1

Les rapports ont été comparés en prenant le 3,4-di-O-méthylglucose comme standard arbitraire (valeur de 1,0). Préalablement à l'analyse, les OPG d'*E. coli* ont été désubstitués.

Tableau 10 : Analyse par méthylation des OPG produits par *E. coli*, *E. chrysanthemi*, et *P. syringae*.

Nous constatons que les OPG produits par les trois souches s'organisent bien autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2, avec les points de branchements doublement substitués en 2 et en 6. Toutefois, le taux de branchement varie selon les souches. En effet, *P. syringae* synthétise les OPG les plus branchés, avec en moyenne, un résidu de glucose non branché pour un résidu de glucose branché. Les OPG d'*E. chrysanthemi* et d'*E. coli* comportent globalement un résidu de glucose branché pour deux résidus de glucose non branchés.

Les résultats obtenus pour *E. coli* sont différents de ceux obtenus pour la souche $mdoH^+/mdoH^-$ décrits au début de ce travail. Ceci peut provenir du fait que nous avons ici effectué les analyses par méthylation sur le squelette glucidique dépourvu de tous substituants. De plus, les OPG synthétisés par la souche $mdoH^+/mdoH^-$ sont produit par la glucosyl-transférase portée sur un plasmide multi copie. Il conviendra d'étudier l'effet de l'amplification de la glucosyl-transférase sur la structure des OPG synthétisés.

2) Analyse par MALDI-MS

Les analyses par MALDI-MS en mode positif des squelettes glucosidiques des OPG synthétisés par *E. coli*, *E. chrysanthemi*, et *P. syringae* sont illustrées respectivement sur la figure 27 A, B, et C, respectivement. Les OPG d'*E. coli* ont été soumis, préalablement à l'analyse, à un traitement alcalin et par l'acide fluorhydrique aqueux, ceci afin de supprimer tous les substituants. On constate que les OPG synthétisés par les trois souches sont composés globalement de 5 à 13 résidus de glucose par molécule. Toutefois, l'hétérogénéité en taille des OPG de *P. syringae* est plus importante. De plus, cette analyse révèle que le degré de polymérisation de l'OPG majoritaire produit diffère selon les bactéries (8 résidus de glucose pour *P. syringae* $[M + Na]^+ = 1499,8$ et 7 pour *E. coli* et *E. chrysanthemi* $[M + Na]^+ = 1337,6$)

3) Analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions.

L'analyse par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à haut pH a été décrite plus précisément lors de la partie précédente. Elle est illustrée sur la figure 28. Le chromatogramme obtenu pour les OPG de *P. syringae* (figure 28C) est beaucoup plus complexe que ceux obtenus pour les OPG d'*E. coli* (figure 28A) et d'*E. chrysanthemi* (figure 28B). Cette analyse permet la séparation des molécules, non seulement en fonction de la taille des composés, mais également en fonction du taux de branchement. Cette complexité confirme donc que le taux de branchement, ainsi que l'hétérogénéité en taille des OPG de *P. syringae*, sont plus grands.

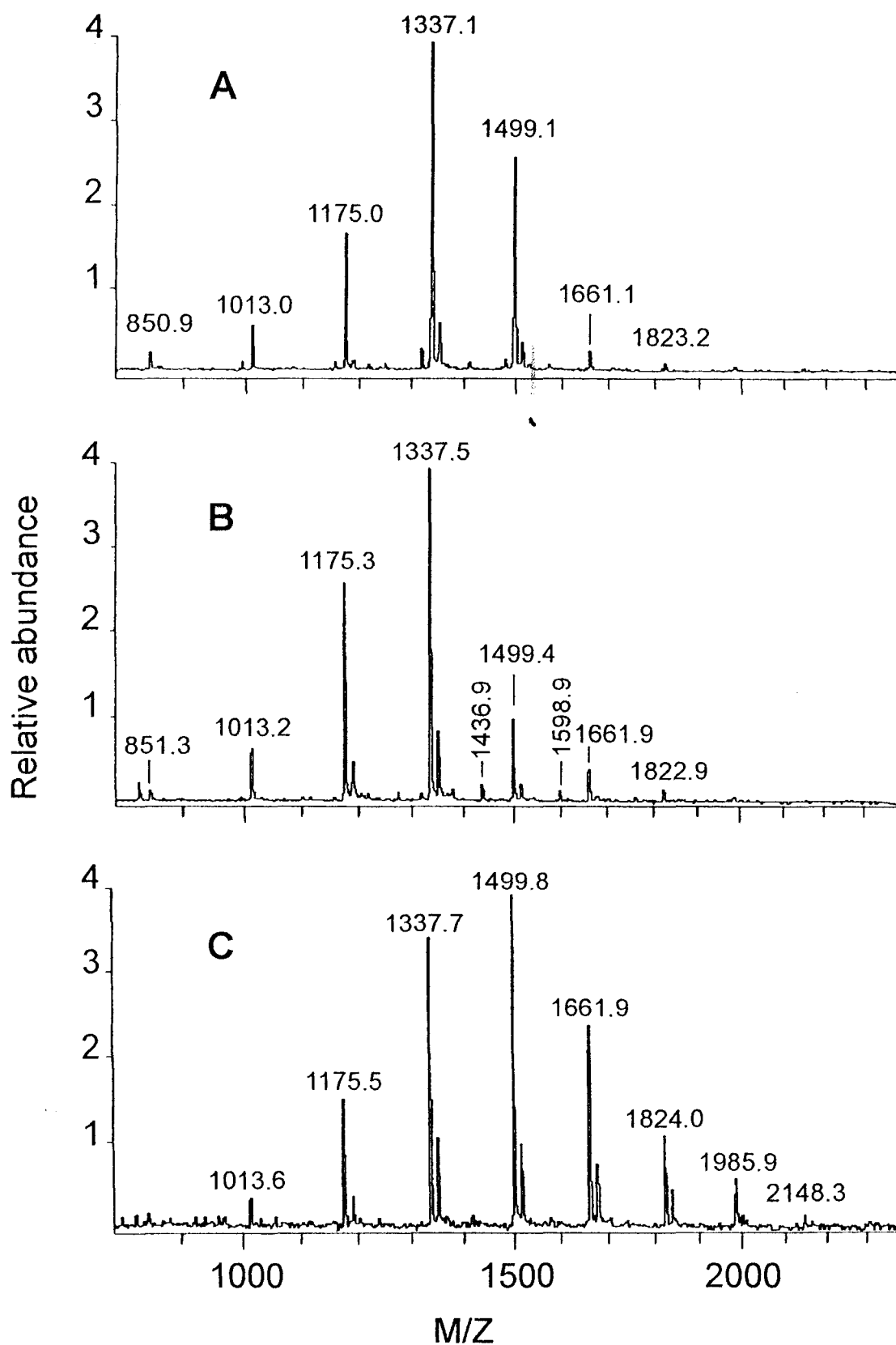


Figure 27 : spectres de masse MALDI obtenus en mode positif des OPG synthétisés par (A) *E. coli*, (B) *E. chrysanthemi*, et (C) *P. syringae*.

Les OPG d'*E. coli* ont été soumis, préalablement à l'analyse, à un traitement alcalin, suivi d'un traitement par l'acide fluorhydrique aqueux.

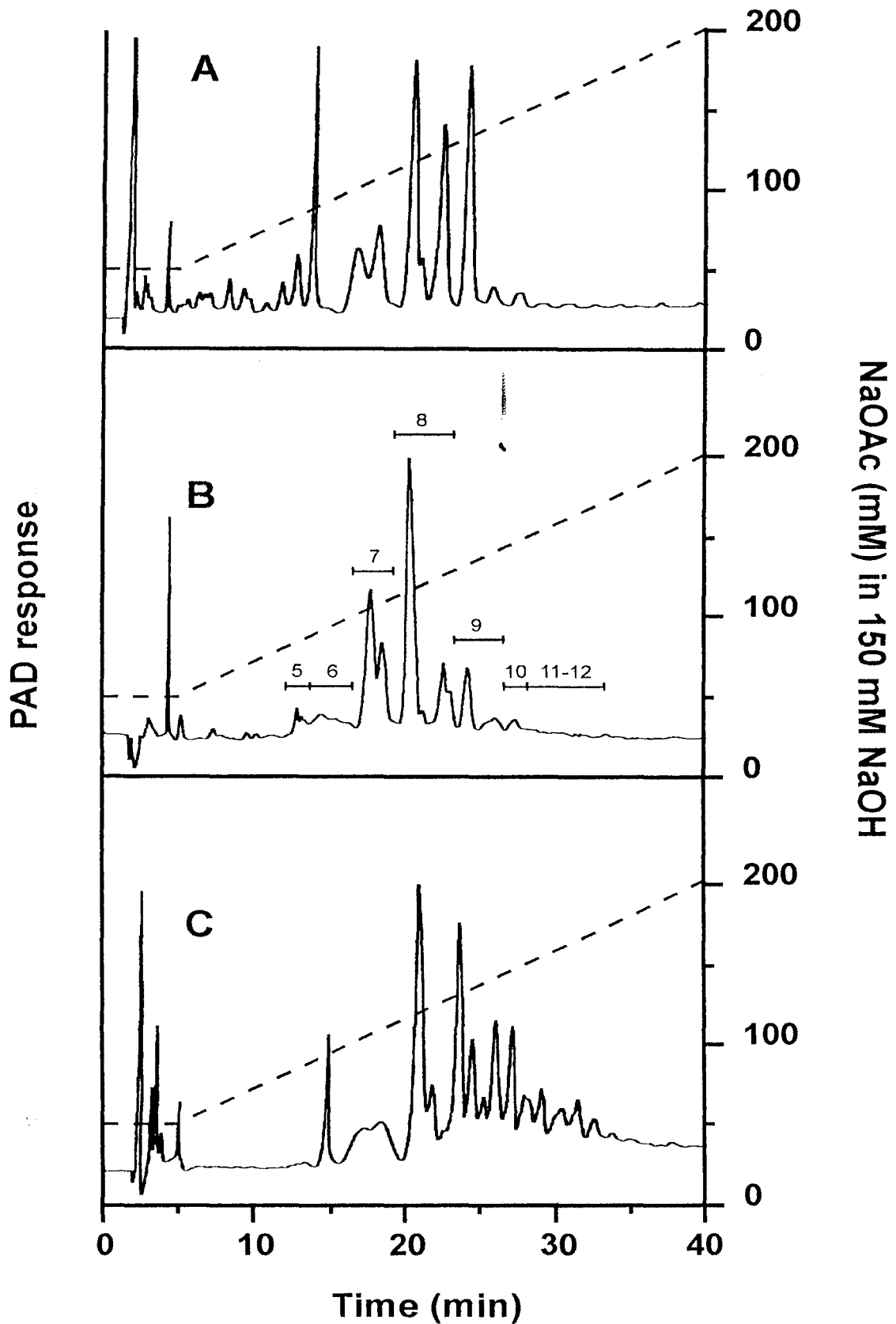


Figure 28 : chromatographies à haute performance d'échanges d'anions à haut pH des OPG synthétisés par (A) *E. coli*, (B) *E. chrysanthemi* et (C) *P. syringae*.

Les OPG d'*E. coli* ont été soumis, préalablement à l'analyse, à un traitement alcalin, suivi d'un traitement par l'acide fluorhydrique aqueux et les OPG d'*E. chrysanthemi* ont été soumis à un traitement alcalin.

C) Etude par RMN

1) Etude par RMN du ^1H

Les trois spectres (figure 29) présentent de très fortes similitudes : les résonances à approximativement 5,40 ppm correspondent à celles des protons anomériques en configuration α des résidus de glucose en position terminale réductrice. Les résonances à approximativement 4,90 et 4,55 ppm correspondent à celles des protons anomériques des résidus de glucose engagés respectivement dans une liaison β -1,2 et β -1,6. La présence des signaux à approximativement 4,20 ppm montrent clairement la présence des H-6 des résidus de glucose branchés par l'intermédiaire d'une liaison β -1,6.

L'analyse par RMN du proton nous montre clairement la présence des résidus de succinate chez les OPG d'*E. chrysanthemi* (figure 29B) et d'*E. coli* (figure 29A). En effet, les signaux à approximativement 2,55 et 2,70 ppm sont caractéristiques de la présence des deux groupements CH_2 qui existent au sein de ce substituant (Leigh et Lee, 1985). On constate que ce substituant n'est pas présent chez les OPG de *P. syringae* (figure 29C), confirmant les résultats précédemment obtenus, et que le niveau de substitution par ces résidus chez *E. chrysanthemi* est très bas, comparable avec le niveau mesuré par MALDI-MS. Le spectre obtenu pour les OPG d'*E. coli* est beaucoup plus complexe, indiquant clairement la présence d'autres substituants.

2) Etude par RMN du ^{13}C

L'analyse par RMN du ^{13}C par la séquence DEPT est illustrée sur la figure 30. Avec l'emploi de cette séquence, les différents CH_2 qui composent la molécule possèdent un signal négatif caractéristique. On note, pour les OPG d'*E. coli* (figure 30A), la présence des signaux à 72, 67,7 et 63,5 ppm (voir également figure 31A) qui correspondent respectivement à la résonance des C-2, C-1 et C-3 des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol (Batley et coll., 1987). Les résonances à 30,4 et 30,1 ppm correspondent à ceux des groupements CH_2 des résidus de succinate. De plus, les résonances à 41,6 et à 64,6 ppm, correspondent respectivement aux groupements α - CH_2 et β - CH_2 des résidus de phosphoéthanolamine. La résonance à 65,8 est caractéristique de celle des C-6 portant une liaison phosphodiester, ce qui indique clairement que les résidus de phosphoglycérol et de phosphoéthanolamine sont liés au squelette glucidique par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester sur le carbone 6 d'un des résidus de glucose.

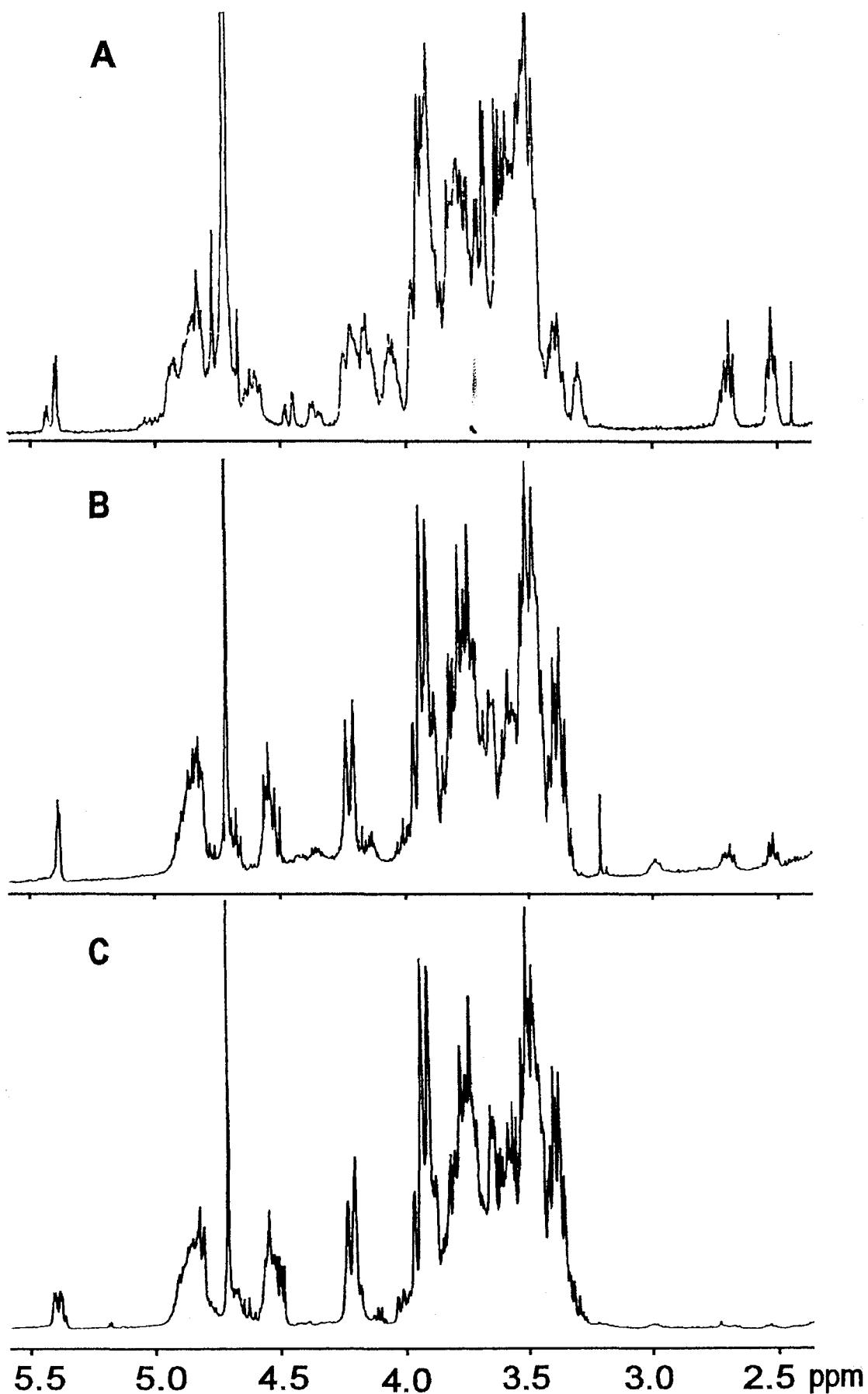


Figure 29 : spectres RMN du proton à 400 MHz des OPG synthétisés par (A) *E. coli*, (B) *E. chrysanthemi*, et (C) *P. syringae*.

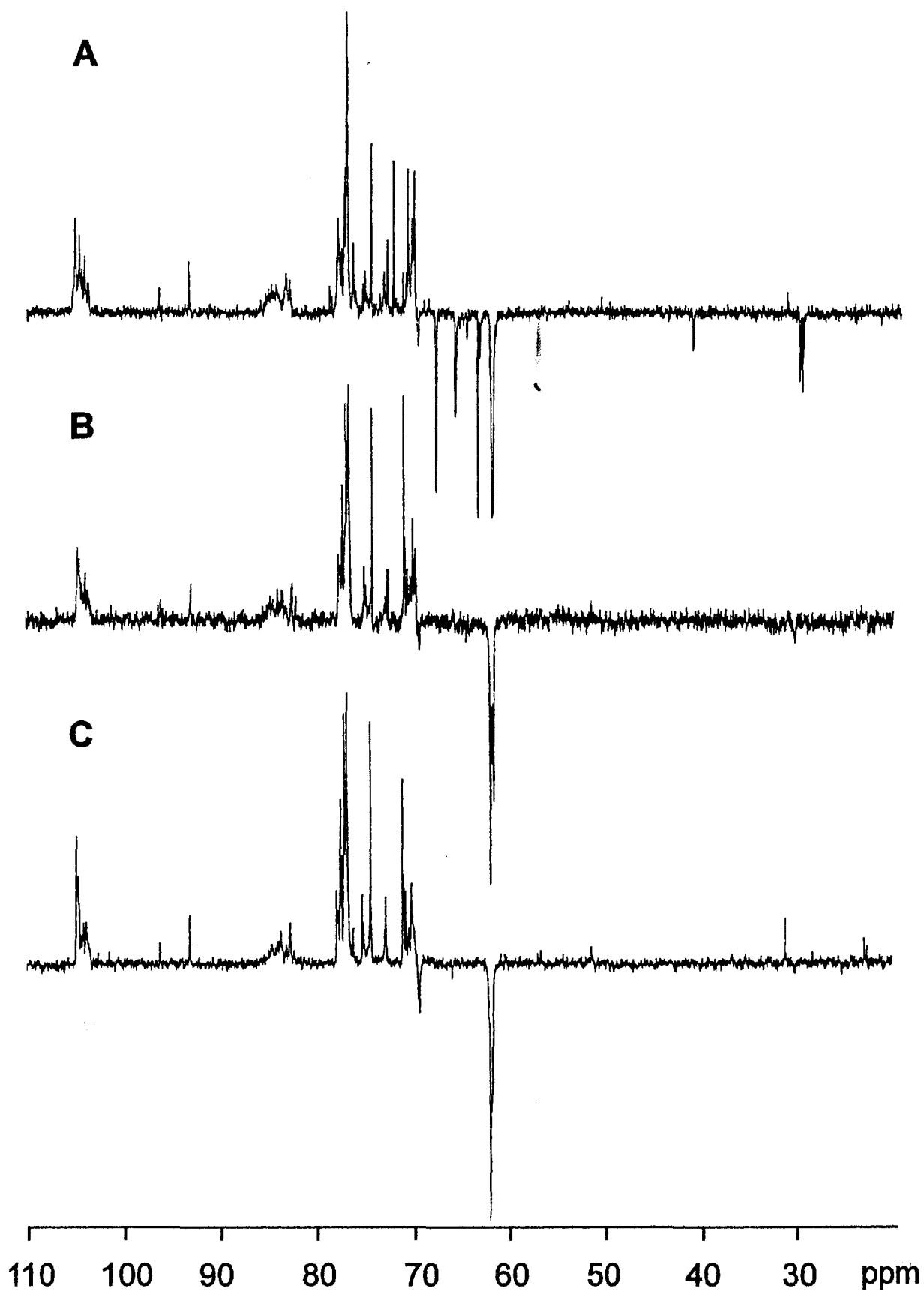


Figure 30 : spectres RMN du ^{13}C à 100 Mhz (séquence DEPT) des OPG synthétisés par (A) *E. coli*, (B) *E. chrysanthemi*, et (C) *P. syringae*.

De même, la présence du signal à 63,2 ppm indique que les résidus de succinate sont liés sur le squelette glucidique par l'intermédiaire d'une liaison O-ester sur le carbone 6.

L'analyse du spectre RMN du ^{13}C est illustrée sur la figure 31. On constate, qu'à part la présence des signaux qui correspondent à ceux des substituants, les spectres sont semblables. Les différents signaux ont déjà été caractérisés dans l'article I. Le squelette glucidique s'organise donc bien, dans les trois cas, autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 sur laquelle les branches constituées d'un seul résidu de glucose, se lient en β -1,6. On peut constater que l'analyse par résonance magnétique du carbone ne permet pas de montrer la présence des résidus de succinate chez les OPG d'*E. chrysanthemi*. Ceci est certainement dû à leur très faible abondance.

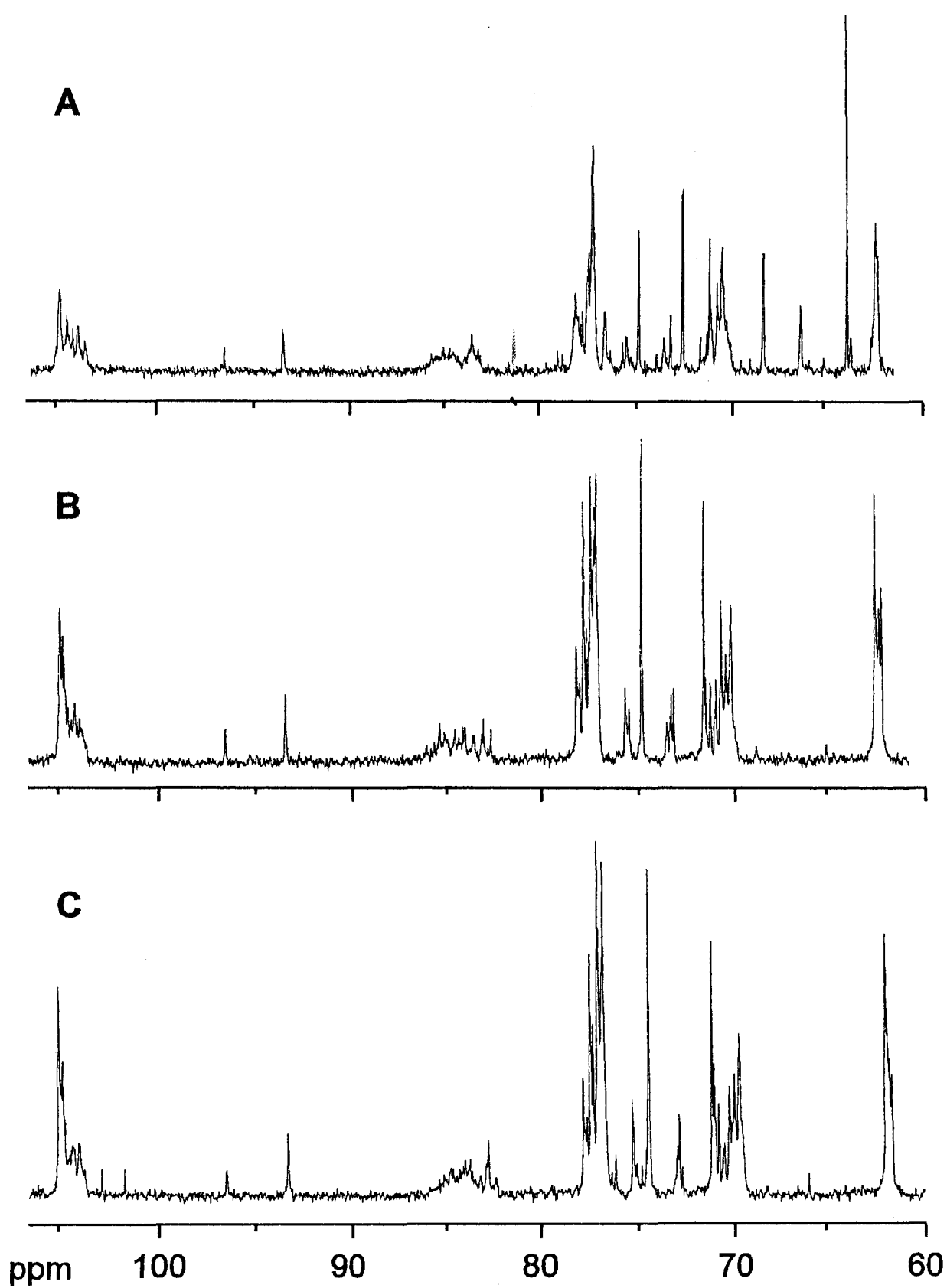


Figure 31 : spectres RMN du ^{13}C à 100 Mhz des OPG synthétisés par (A) *E. coli*, (B) *E. chrysanthemi*, et (C) *P. syringae*.

V) Etude de la structure des glucanes associés à *Burkholderia solanacearum* et *Xanthomonas* *campestris*.

Comme nous l'avons vu précédemment, *P. syringae* et *E. chrysanthemi*, deux bactéries phytopathogènes, synthétisent des OPG similaires. Nous avons prolongé l'étude de la structure des OPG en choisissant des bactéries faisant partie du groupe des Pseudomonades. En effet, ce groupe (Palleroni, 1992) contient de nombreuses bactéries classées aujourd'hui dans trois (gamma, bêta et alpha) des cinq subdivisions des protéobactéries. Nous avons donc choisi d'étudier dans un premier temps les OPG synthétisés par *B. solanacearum* et *X. campestris* pv. citri, deux bactéries pathogènes de très nombreuses plantes d'importances majeures pour l'agriculture. Ces bactéries possèdent de nombreux caractères de virulence communs, malgré une grande différence taxonomique (*X. campestris* fait partie de la subdivision gamma et *B. solanacearum* fait partie de la subdivision bêta des protéobactéries). Amemura et Cabrera-Crespo (1986) ont montré par des études par RMN du ^{13}C et du ^1H , ainsi que par des analyses de méthylation que *X. oryzae* synthétisait des glucanes possédant une liaison α et 15 liaisons β , ainsi qu'une liaison 1,6 et 15 liaisons 1,2. Le glucane majeur possède donc 16 résidus de glucose par molécule et *X. campestris* semble, après analyse par HPLC, synthétiser des glucanes homologues.

Les résultats de nos analyses sont présentés dans l'article II, ci-après : **Talaga, P., B. Stahl, J.-M. Wieruszski, F. Hillenkamp, S. Tsuyumu, G. Lippens, and J.-P. Bohin.** Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. citri: a new family of periplasmic glucans. Accepté pour publication dans Journal of Bacteriology. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Guy Lippens et Jean-Michel Wieruszski du laboratoire de RMN de l'Institut Pasteur de Lille. Il a été réalisé dans le cadre d'un projet du Laboratoire Européen Associé « Analyse structure-fonction de biomolécules : approche multidisciplinaire » (CNRS, France-FNRS, Belgium).

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en fin de phase stationnaire dans un milieu de basse osmolarité. Les OPG ont été extraits par la méthode à l'acide trichloroacétique et purifiés par

chromatographie de tamisage moléculaire (figure 1), puis préalablement à l'analyse par RMN par chromatographie haute performance d'échanges d'anions à haut pH (figure 3). Les analyses par MALDI (figure 2) ont montré que *B. solanacearum* et *X. campestris* synthétisent des OPG cycliques non substitués composés de 13 et 16 résidus de glucose par molécule, respectivement. Les analyses par méthylation ont montré que ces glucanes étaient liés par l'intermédiaire de liaisons glycosidique en 1,2, et une liaison en 1,6. Les analyses par RMN homonucléaires et hétéronucléaires (figure 5) à 600 MHz révèlent la présence d'une liaison en α -1,6, tandis que tous les autres résidus de glucose sont liés par l'intermédiaire de liaisons en β -1,2. La présence de cette liaison α -1,6 au sein du cycle induit de telles contraintes structurales que l'on est capable de distinguer chacun des résidus de glucose du cycle lors de l'analyse par RMN du ^1H (figure 4). Les différents signaux des protons anomériques composant la molécule permettent d'établir la séquence primaire (figure 7) de ces deux glucanes en faisant une marche séquentielle (analyse par HMBC ; figure 6). Les caractéristiques structurales de ces glucanes diffèrent fortement de celles des OPG précédemment décrits.

Le glucane synthétisé par *B. solanacearum* a été enrichi en ^{13}C , ceci afin d'étudier par RMN le comportement conformationnel de ce glucane en solution. Ces mesures expérimentales serviront à corroborer, à diriger ou encore à vérifier les résultats de calcul de modélisation moléculaire de cette molécule. Toutes ces analyses permettront d'analyser et de prédire la ou les conformations adoptées par celle-ci.

Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans

PHILIPPE TALAGA,¹ BERND STAHL,^{2†} JEAN-MICHEL WIERUSZESKI,³
FRANZ HILLENKAMP,² SHINJI TSUYUMU,⁴ GUY LIPPENS,³ AND JEAN-PIERRE BOHIN^{1*}.

*Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France,*¹ *Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Münster, D-48149 Münster, Germany,*² *CNRS URA 1309, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France,*³ *and Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422, Japan*⁴

[†] Present address: Milupa GmbH & Co. KG, Research International, D-61381-Friedrichsdorf, Germany.

* Corresponding author. Phone: 20 43 65 92; Fax: 20 43 65 55; Electronic mail address: BOHIN@CITI2.FR.

SUMMARY

The cell-associated glucans produced by *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri* were isolated by trichloroacetic acid treatment and gel permeation chromatography. Compounds obtained were characterized by compositional analysis, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography. *B. solanacearum* synthesizes only a neutral cyclic glucan containing 13 glucose residues and *X. campestris* pv. *citri* synthesizes a neutral cyclic glucan containing 16 glucose residues. The two glucans were further purified by high-performance anion-exchange chromatography. Methylation analysis revealed that these glucans are linked by 1,2 glycosidic bonds and one 1,6 glycosidic bond. 600 MHz homonuclear and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ heteronuclear nuclear magnetic resonance experiments revealed the presence of a single α -1,6 glycosidic linkage, whereas all other glucose residues are β -1,2 linked. The presence of this single α -1,6 linkage, however, induces such structural constraints in these cyclic glucans that all individual glucose residues could be distinguished. The different anomeric proton signals allowed a complete sequence-specific assignment of both glucans. The structural characteristics of these glucans contrast with the previously described osmoregulated periplasmic glucans.

INTRODUCTION

Cell-surface carbohydrates are involved in bacterium-plant interactions in both cases of pathogenesis and symbiosis (6, 7, 15, 16). Three fundamentally distinct categories of carbohydrate structures can be observed in Gram-negative bacteria: exopolysaccharides (EPS) can form a cell-associated capsule or a fluidal slime; lipopolysaccharides (LPS) are an intrinsic part of the outer membrane; osmoregulated periplasmic glucans (OPG) were only recently recognized as general constituents of the Gram-negative envelopes, and are particularly abundant when the medium osmolarity is low. These later compounds were essentially studied in members of the family *Rhizobiaceae* where they are known as cyclic β -glucans (6).

Numbers of studies have demonstrated that *Agrobacterium* and *Rhizobium* species synthesize OPG with similar structures (for a review see 6, 12). In both genera, OPG are composed of a cyclic β -1,2-linked backbone containing 17 to 40 glucose residues, which can be substituted by *sn*-1-phosphoglycerol (20), as well as by methylmalonic acid or succinic acid (13). OPG-defective mutants of *R. meliloti* form ineffective white pseudonodules on alfalfa (11) and OPG-defective mutants of *A. tumefaciens* are avirulent (28). Extracts of *Bradyrhizobium* spp. revealed the presence of cyclic OPG linked by both β -1,3 and β -1,6 glycosidic bonds, containing 10 to 13 glucose residues (21), which can be substituted by phosphocholine (29). OPG-defective mutants of *Bradyrhizobium japonicum* formed ineffective nodules on soybean (5). Several authors have emphasized the cyclic character of these OPG which was supposed to permit inclusion complexes with hydrophobic guest molecules (6). This property could be essential for an efficient interaction with the host plant.

In a recent study we have shown that OPG of an unrelated phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, are essentially different from OPG of the *Rhizobiaceae* (32). *P. syringae* synthesizes acyclic, unsubstituted OPG which range from 6 to 13 glucose residues, with the principal species containing 9 glucose residues. The structure is highly branched, the backbone consisting of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages (32). These OPG play a role in the plant infection process of this bacteria, as genes at the *hrpM* locus, governing the OPG biosynthesis, are required for both the expression of disease symptoms on *Phaseolus vulgaris*, the common bean, and the development of the hypersensitive reaction on non-host plants (18, 23). These OPG are very similar to those previously described as MDO (Membrane Derived Oligosaccharides) in *Escherichia coli* by Kennedy and co-workers (14), and OPG-biosynthetic gene sequences are highly conserved between *E. coli* and *P. syringae* (17).

This observation opened the question of the degree of diversity of OPG structures among bacteria. Many phytopathogenic bacteria are pseudomonads, a group of bacteria in which the representative genus, *Pseudomonas*, is itself very heterogeneous (24). Structural characterization of the OPG synthesized by these bacteria is an essential prerequisite in the establishment of their potential roles in the development of the pathogenesis pathway. In a first attempt, two species were chosen because of similarities in their virulence characters despite their different taxonomic positions: *Pseudomonas* (now *Burkholderia*) *solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Amemura and Cabrera-Crespo (1) had previously reported the presence in the low-*M_r*, neutral polysaccharides of several strains of *Xanthomonas orizae*, *Xanthomonas phaseoli*, and *X. campestris* of cyclic β -1,2 glucans with a 1,6 linkage. Moreover, these authors had described a glucan with a degree of polymerization of 16 and one α -linkage in *X. orizae*. We confirmed these observations in a different strain of *X. campestris*,

and establish through high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) the complete sequence of the glucose residues. We demonstrate the cell-associated character of this glucan, and show that *B. solanacearum* synthesizes a similar but distinct glucan structure containing only 13 units.

(A preliminary report of this work has appeared previously: G. Lippens, P. Talaga, J.-M. Wieruszkeski, and J.-P. Bohin [1995] p. 423-424. *In* J.-C. Merlin, S. Turrell, J.-P. Huvenne [ed.], Spectroscopy of biological molecules, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth. *B. solanacearum* strain T11 (4) and *X. campestris* pv. *citri* strain N1 were from the culture collection of the Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan. They were grown in LOS (Low Osmolarity) medium at 24°C with agitation (32).

Isolation and Purification of Cell-Associated Oligosaccharides. Bacteria were collected during the early exponential phase of growth by centrifugation at 4°C for 15 min at 8,000 x g. Cell pellets were extracted with 5 % trichloroacetic acid (TCA), the TCA extracts were neutralized with ammonium hydroxide, and were desalted on a Sephadex G-15 column. The desalted material was then fractionated by gel filtration on a Bio-Gel P-6 (Bio-Rad). The column (60 x 1.6 cm) was eluted at room temperature with 0.5% acetic acid at a flow rate of 15ml/h and fractions of 2.5 ml were collected. The oligosaccharides emerged in a peak of intermediate weight detected by the phenol-sulfuric acid procedure (8). Fractions containing oligosaccharides were pooled and lyophilized.

MALDI Mass Spectrometry. The experiments were carried out on a VISION 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm wavelength and a 3 ns pulse width). After selection of the appropriate site on the target by a microscope, the laser light was focused onto the sample/matrix mixture at an angle of 15° and at a power level from 10⁶ to 10⁷ watts/cm². Positive ions were extracted by 5-10 keV acceleration potential, focused by a lens and mass separated in a reflectron time of flight instrument. At the detector, ions were postaccelerated to 20 keV for maximum detection efficiency. The resulting signals were recorded with a fast transient digitizer with a maximum

of 2.5 ns channel resolution, and transferred to a PC for accumulation, calibration, and storage. All MALDI mass spectra are the result of a 20 single-shot accumulation.

2,5-Dihydroxybenzoic acid (31) being the most effective matrix for this compound class was used in all cases (10 g/liter in water). Lyophilized oligosaccharides samples were redissolved in doubly distilled water and then diluted with an appropriate volume of the matrix solution (1:5, v/v). 1 μ l of the resulting solution was deposited onto a stainless steel target, and the solvent was evaporated under gentle stream of warm air.

High performance Anion-exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). Analysis of oligosaccharides was performed on a CarboPac PA100 anion-exchange column (4 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA), equipped with a CarboPac PA guard column (3 x 25 mm, Dionex). Oligosaccharides were detected with pulsed amperometric detector PAD II with a gold electrode (Dionex). The following pulse potentials and durations were used for detection: $E_1 = 0.05$ V ($t_1 = 300$ ms); $E_2 = 0.60$ V ($t_2 = 120$ ms); $E_3 = -0.60$ V ($t_3 = 300$ ms). The chromatographic data were integrated and plotted using a Spectra-Physic model SP 4270 integrator (San Jose, CA). Oligosaccharides were eluted at a flow rate of 1 ml/min by a two-step procedure consisting of (a) 0.05 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 5 min, and (b) a linear gradient of 0.05-0.2 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 35 min. After every run, the column was re-equilibrated in 0.05 M NaOH in 0.15 M NaOH for 15 min.

Preparation of the oligosaccharides was done in a similar way on a CarboPac PA-1 (10 x 250) at a flow rate of 2 ml/min. Fractions were collected, and separated on a AG 50W-X8 (H^+ form, 100-200 mesh, Bio-Rad) column (5 x 1 cm) eluted with water. By this procedure, sodium acetate was converted into acetic acid and NaOH into water. The acetic acid produced by this method was neutralized by NH_4OH . Some Na^+ was left, which was

subsequently removed by desalting on a Biogel-P4 column. The concentration of the contaminating oxidized products was low enough that it does not interfere with the analysis.

Methylation analysis. The oligosaccharides were methylated according to Paz-Parente *et al.* (26). The methyl ethers were obtained after methanolysis (0.5 M MeOH-HCL, 24 h, 80°C) and analyzed as partially methylated methyl glycosides by gas-liquid chromatography/mass spectrometry (GLC-MS; 9). The gas liquid chromatography was performed using a Delsi apparatus with a capillary column (25 m x 0.2 mm) coated with DB-1 (0.5- μ m-film thickness) applying a temperature gradient from 110°C to 240°C at 3°C/min, and a helium pressure of 40 kPa. The mass spectra were recorded on a Nermag 10-10B mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France) using an electron energy of 70eV and an ionizing current of 0.2 mA.

NMR Spectroscopy. Prior to NMR spectroscopy analysis, the oligosaccharides were twice treated with $^2\text{H}_2\text{O}$ at room temperature. After each exchange treatment, the materials were lyophilized. Finally, each sample was redissolved in 0.5 ml of $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.96 atom % ^2H , Aldrich) giving 22 mM and 7 mM solutions for the cell-associated glucans of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. *citri*, respectively. The NMR experiments were performed on a Bruker DMX-600 Spectrometer controlled with a Silicon Graphics INDY computer and equipped with a triple resonance $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ self-shielded z-gradient probehead at a temperature of 28°C. All spectra were recorded without sample spinning. Chemical shifts (δ) are referenced to acetone as internal standard. The two-dimensional homonuclear COSY (correlation spectroscopy) 90, relayed- and double-relayed COSY, TOCSY (total correlated spectroscopy) and NOESY (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy) experiments, and the two-dimensional HSQC (heteronuclear single quantum coherence), HSQC-NOESY, and the HSQC-TOCSY experiments were performed using standard Bruker pulse programs. Spectra

were acquired with 1024 x 256 complex points and transformed after zero filling to 2k x 1k and multiplication with a $\pi/3$ shifted squared sine in both dimensions.

HSQC-NOESY experiments were obtained with mixing times of 100 to 300 ms; HSQC-TOCSY were performed with 100 to 200 ms mixing times and the HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) were realized with a 100 ms delay for evolution of long range coupling (3J ^1H - ^{13}C) of 5 Hz.

Others Methods. Protein concentrations were determined with the method of Lowry *et al.* (19) with bovine serum albumin as a reference protein. Total carbohydrate concentrations were determined by the phenol-sulfuric acid method of Dubois *et al.* (8) with D-glucose as the standard. Sugar analysis was carried out by gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of methyl glycosides formed by methanolysis in 0.5 M HCl in methanol at 80°C for 24 h (22). Reducing sugars were measured with the same method after reduction of the oligosaccharides with NaBH_4 . Succinate, glycerol, and total phosphorus were measured as previously described (32).

RESULTS

Isolation and characterization of the cell-associated glucans. Cell-associated oligosaccharides were extracted from cells of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. *citri* which were grown in a medium of low osmolarity, according to previously described procedures which involved trichloroacetic extraction. This extraction procedure was shown to allow the recovery of more than 90% of ^{14}C -glucose labeled MDO in *Escherichia coli* (data not shown). The fractionation on a Biogel P-6 column allowed the separation of two main sugar-containing compounds (Fig. 1A and B). The compounds eluting at the void volume of the column were probably high-molecular weight lipo- or exopolysaccharides (32). The second peak represents the cell-associated oligosaccharides. Although the levels of the cell-associated oligosaccharides were similar for both bacteria (23 and 17 mg of equivalent glucose per g of cell protein for *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. *citri* respectively), the elution volumes indicated that the oligosaccharides produced by were smaller than the oligosaccharides produced by. A compositional analysis of the cell-associated oligosaccharides was performed and revealed that glucose could account for all of the carbohydrate present, indicating the absence of contaminating lipo- or exopolysaccharide material (data not shown). Further analysis of these samples demonstrated the absence of succinic acid, glycerol and phosphorus. Gas liquid chromatography analysis of the reduced glucans after methanolysis and silylation reactions revealed an absence of detectable reducing glucose within the preparation.

MALDI Mass Spectrometry. Quasimolecular ions were obtained by means of the MALDI mass spectrometric method (Figs. 2A and 2B). Theoretical masses were calculated with unit mass resolution. This analysis for the glucans of *B. solanacearum* gave one quasimolecular ion at m/z 2129.7 (Fig. 2A), which agrees with the calculated mass for an

$[M+Na]^+$ ion based on a unsubstituted 13-membered cyclic glucan. For the glucans of *X. campestris* pv. citri, one quasimolecular ion at m/z 2616.8 (Fig. 2B) agrees with the calculated mass for an $[M+Na]^+$ ion based on a cyclic unsubstituted 16-membered cyclic glucan. No fragment ions at the applied laser energy are present, confirming that MALDI is a very soft desorption / ionization technique. Peaks corresponding to the $[M+K]^+$ are also present with masses increased by 16 above the masses of the corresponding sodiated ions. This capability to form adduct ions with sodium and potassium has also been observed with the cyclic β -1,2-glucans produced by *Rhizobium trifolii* (10). In the *X. campestris* spectrum, cyclic glucans with a higher degree of polymerization (17 to 19 glucose residues per molecule) can be detected with extension of the intensity scale by a factor of 20. All these data indicate that, in both cases, the glucan produced is homogeneous in size, in contrast to the previously described osmoregulated periplasmic glucans (6). Preliminary 1H NMR analysis confirmed the fact that the glucans produced by *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri were unsubstituted, but the presence of a low concentration of contaminants forced us to add a second purification step.

HPAEC-PAD analysis. The glucans were analyzed by HPAEC-PAD on a Carbopac PA-100 column. The chromatograms of the glucans of *B. solanacearum* (Fig. 3A) and *X. campestris* pv. citri (Fig. 3B) revealed the presence of a major peak in both cases with a retention time of 21 and 27 min for the glucans of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri, respectively. This analysis confirms the results obtained by MALDI mass spectrometry, as in general the retention time of a homologous series of carbohydrates increases as the degree of polymerization increases. For the glucans of *X. campestris*, minor compounds which were eluted later can be detected, corresponding most probably to the higher cyclic glucans observed by MALDI mass spectrometry. Further purification of the glucans was performed

within the same conditions but on a Carbowac PA-1 preparative column, and the main peak was collected, desalted, lyophilized and used for structures determination.

Methylation analysis. Purified glucans were methylated, methanolized, and after acetylation, subjected to GLC-MS analysis. Methylation analysis showed the presence of 3,4,6-Me₃Glc, and 3,4-Me₂Glc in the ratio 11.8:1 and 15.2:1 for the glucans of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri, respectively. These results indicated that the cyclic-glucans were composed of one 1,6-linked glucosyl residue with all the other glucose units joined by 1,2-glycosidic linkages, and the absence of nonreducing terminal glucose residue suggests that this glucan has no branch point.

Assignment strategy for the NMR analysis. In the 1D ¹H NMR spectra, glucose residues are labeled **a-m** and **a-p** in decreasing order of the chemical shifts of the H-1 resonances for the cell-associated glucans of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri, respectively. The ¹H and ¹³C chemical shifts cover a relatively small region from 3.3 to 5.3 ppm for ¹H and 61 to 105 ppm for ¹³C. The assignments of the different protons of every glucose unit were based on COSY, relayed, and double-relayed experiments, together with TOCSY experiments. The carbon assignments were based on ¹H/¹³C HSQC and HSQC-TOCSY spectra. The glucose residues were then linked together by a sequential assignment procedure based on the interresidue ¹H/¹³C multiple-bond correlations observed in the HMBC spectra and on the NOE effects between the H-1/H-2' protons in HSQC-NOESY experiments.

NMR analysis of the cell-associated glucan of *B. solanacearum*. The ¹H NMR spectrum (Fig. 4A) shows the presence of a doublet signal at 5.175 ppm with a small coupling constant $J_{1,2}$ of 3.3 Hz that revealed the α -anomeric configuration of the glucose residue **a**. The other 12 anomeric signals are split by a coupling constant $J_{1,2}$ larger than 7.6 Hz, indicating the β -anomeric configuration of the glucose residues **b** to **m**. Starting from the

anomeric protons, the different homonuclear correlation experiments lead to the attribution of all the proton signals. H-1 and H-2 proton assignments are listed in Table 1. These informations were used to extract the carbon frequencies from the HSQC spectrum shown in Fig. 5A. We list in Table 2 the C-1 and C-2 values of all the glucose residues. A small number of resonances attracts special attention. The upfield shifted cross peaks a3 and a5 (Fig. 5A) confirm the α -anomeric configuration of the residue a. Whereas all C-2 and C-6 resonances fall in the range of 80-85.2 ppm and 61.5-62.5 ppm respectively, the f residue has a C-2 frequency of 74.86 ppm and its H-6 resonances ($\delta = 3.848$ and 3.901 ppm) correlate with a carbon at 68.95 ppm (cross peak f6 and f6', Fig. 5A). Therefore, the f residue has a characteristic upfield shifted C-2 and a significantly downfield shifted C-6 ($\Delta\delta \sim 7$ ppm). This clearly indicates that this residue has a free OH group at the C-2 position and a OH group at the C-6 position engaged in a glycosidic linkage, contrarily to all the other glucose residues. Furthermore, the absence of any cross peaks at 92 to 96 ppm in the HSQC spectra, corresponding to the C-1 of a reducing glucose residue, confirms the cyclic nature of the glucan.

A sequential assignment procedure was used to link the sugar residues. The observation of a strong cross-peak between the anomeric H-1 proton of the residue a and the C-6 carbon of the residue f (i.e., cross peak aH-1/C-6) in the HMBC spectrum (fig. 6A) unambiguously assigns residue a as being linked to residue f via a α -1,6 linkage. Furthermore, the intraresidue contacts H-1/C-3 and H-1/C-5 confirm the α -anomeric conformation of this residue. For the other glucoses, no such strong intraresidue long range correlation was observed confirming the β -anomeric hexapyranoside configuration of these residues. All others HMBC cross peaks linked C-2' to H-1, confirming the β -1,2 linkages. Combining the previously determined H-1 and C-2 attribution with these HMBC cross peaks, a sequential walk through the molecule was established (Fig. 7A).

This primary sequence is in agreement with the nuclear Overhauser enhancement pattern obtained from the HSQC-NOESY experiment (data not shown) where the cross peaks are no longer based on the long-range coupling constant over the glycosidic linkage but on the short H-1/H-2' internuclear distance.

NMR analysis of the cell-associated glucan of *X. campestris* pv. *citri*. The ^1H NMR spectrum (Fig. 4B) revealed many similarities with the ^1H NMR spectrum of the cell-associated glucan of *B. solanacearum*. The residue **a** at 5.172 ppm is in the α -anomeric configuration ($J_{1,2} = 3.4$ Hz). The extended spectrum revealed the presence of 15 doublet signals with a coupling constant larger than 7.6 Hz, which indicates the β -anomeric configuration of the glucose residues **b** to **p**. The attribution of all the proton signals are done as described above. H-1 and H-2 protons assignments are listed in Table 1. The $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC spectrum is shown in fig. 5B. The H-6 and H-6' resonances of residue **i** were correlated to its C-6 at 68.91 ppm (Fig. 5B) and the C-2 carbon of this residue is characteristically upfield shifted (~ 7 ppm), clearly indicating that this residue has a free OH group at the C-2 position. The C-1 and C-2 assignments obtained are listed in Table 2.

The glucose residues were then linked one to each others, and the strong cross-peak between the anomeric H-1 of the residue **a** and the C-6 carbon of the glucose residue **i** in the HMBC spectrum (Fig. 6B) uniquely assigns residue **a** as being linked to residue **i** via a α -1,6 linkage. All the other glucose residues are linked via β -1,2 glycosidic linkages, as confirmed by the HSQC-NOESY experiment (data not shown).

From analysis of all the NMR data, the primary structure of the cell-associated glucan of *X. campestris* pv. *citri* was determined as shown in figure 7B.

DISCUSSION

The present study describes the structure of glucans extracted from cells of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri, and demonstrates that they are fundamentally different from the major class of previously described OPG of phytopathogenic bacteria. Although they share the cyclic nature with the OPG of members of the *Rhizobiaceae* family, at least three fundamental differences distinguish both classes of OPG: (i) the molecules described here are restricted to one degree of polymerization (13 for *B. solanacearum* and 16 for *X. campestris* pv. citri), whereas a size distribution appears in the OPG of the *Rhizobiaceae* (ranging from 17 to 25 for *A. tumefaciens*, for example); (ii) they possess a single α -1,6 linkage whereas most previously described OPG are characterized by either a homogenous β -1,2 linkage pattern, or β -1,3 and β -1,6 linkages; (iii) they exhibit a structural rigidity as demonstrated by the distinct chemical shift values of all anomeric protons, whereas NMR studies carried out on the cyclic β -1,2 glucans of *Rhizobium* spp. revealed that all glucopyranosyl residues are magnetically equivalent (2, 27). These differences might all have clear structural and functional implications, which will be discussed below.

(i) the overall ring size distributions of the cyclic β -1,2 glucans were found to be very similar among the different species of the *Rhizobiaceae* (6). Therefore, it seems unlikely that the cyclic glucan backbones themselves confer specificity during legume nodulation. The unique size of cyclic glucans synthesized by both bacteria described in this report might point towards an enhanced specificity in the phytopathogenic character. However, in a previous analyses of glucans containing β -1,2 glucosidic linkages from *X. oryzae* (IFO3312), Amemura and Cagrerá-Crespo (1) have shown that the main glucan has a degree of polymerization of 16,

was cyclic in nature, and contains one α linkage and one 1-6 glycosidic linkage. The ^1H and ^{13}C NMR data revealed strong similarities with those of the cell-associated glucans of *X. campestris* pv. *citri* described in this work. Thus, *X. oryzae* synthesizes a cell-associated glucan identical to that of *X. campestris*, and this character appears to be specific of the genus *Xanthomonas* rather than of a particular plant-bacterium interaction.

For the cyclic all β -1,2 glucans of *A. tumefaciens* the size distribution appears to result from competing elongation and cyclization reactions (33). The unique size of the cyclic glucans found in *B. solanacearum* and *X. campestris* indicates that there is no such competition, but points to a highly specific enzyme responsible for cyclization. Moreover, the active sites of the enzymes involved in cyclization process are presumably structured such that cyclic glucans of different length are accommodated in the two bacteria.

(ii) Cyclic β -1,2 glucans with DP below 17 have never been found within rhizobial cultures, suggesting perhaps that those smaller structures may not be energetically favorable. This hypothesis was validated by extensive Monte carlo simulations indicating the unfavorable energetics of such smaller cycles (34). In the molecules described here, the number of units is in both cases smaller than 17, indicating that the presence of one α -1,6 linkage relieves to some extent the constraint. Even though we do not know whether the α -1,6 linkage is formed at the initiation, elongation or cyclization step, the enzymes responsible for the biosynthesis of the cyclic glucans described here have to provide a substantial amount of free energy in order to obtain a cyclic structure.

(iii) Whereas the cyclic all β -1,2 glucans show only 6 carbon and 7 proton resonances, all anomeric proton resonances can be distinguished individually in the two cyclic molecules described in this report. The largest dispersion is found for the H-1 and C-2 resonances,

representative for the successive β -1,2 linkages. André *et al.* have obtained relaxed conformational maps for β -sophorose by molecular mechanics calculations (3), and considered these zones of low energy as starting models for the conformation of a DP17 cyclic β -D-glucan (2). They arrived at the conclusion of a non-symmetrical overall shape with a small cavity, in contrast to earlier studies in which a quite regular structure with a large cavity was proposed (25, 30). As the chemical shift is a very sensitive probe of the 3D environment of the spin, the different β -1,2 linkages in the OPG of *B. solanacearum* and *X. campestris* are characterized by different positions in this (Φ, Ψ) map, without the motional averaging that leads most probably to the unique set of chemical shifts in the β -1,2 glucans. In this respect, it is worth noting that the anomeric protons can be distinguished while no line broadening is observed. This clearly shows that the dynamic averaging in these molecules is limited. A second interesting observation is that the anomeric protons of the DP13 and DP16 can be divided into different groups: the α -linked **a** residue, a first group of anomeric protons resonating downfield of 5.0 ppm (4.95 ppm) in DP13 (DP16), a second group upfield of the same ppm values, and finally the **m** (**p**) residue that precedes the one α -1,6 linkage. Further structural studies are required to determine whether the different groups are representative of different low-energy conformations as calculated for β -sophorose, and whether the cavity size of these molecules is eventually compatible with a complexing host character.

The present work is the first step toward a precise biochemical definition of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* and *X. campestris* pv. citri. It demonstrates that the future studies on the correlation cell-associated glucans with virulence will have to take into account the new structural features of these compounds. Additional studies in progress are aimed at further elucidating the cellular location, dependence on medium osmolarity, and detailed molecular modeling of these unusual glucans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yves Leroy for the GLC-MS analyses and Jianru Stahl-Zeng for recording the MALDI mass spectra of the cell-associated glucan extracted from *B. solanacearum*. We are also grateful to Anne Bohin for excellent technical assistance in culture of phytopathogenic bacteria. This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, and by the CNRS (UMR111 and URA1309). It was performed as a collaborative effort of the Laboratoire Européen Associé "Analyse structure-fonction de biomolécules : approche multidisciplinaire" (CNRS, France-FNRS, Belgium).

REFERENCES

1. Amemura, A., and J. Cabrera-Crespo. 1986. Extracellular oligosaccharides and Low- M_r polysaccharides containing (1,2)- β -D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. **132**:2443-2452.
2. André, I., K. Mazeau, F. R. Taravel, and I. Tvaroska. 1995. Conformation and dynamics of a cyclic (1,2)- β -D-glucan. Int. J. Biol. Macromol. **17**:189-198.
3. André, I., K. Mazeau, F. R. Taravel, and I. Tvaroska. 1995. NMR and molecular modelling of sophorose and sophotriose in solution. New. J. Chem. **19**:331-339.
4. Arwiyanto, A., M. Goto, S. Tsuyumu, and Y. Takinawa. 1994. Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan. **60**:421-430.
5. Bhagwat, A. A., and D. L. Keister. 1995. Site-directed mutagenesis of the β -(1,3);(1,6)-D-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**:366-370.
6. Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of the family *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. **58**:145-161.
7. Denny, T. P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. **58**:145-161.
8. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. **28**:350-356.
9. Fournet, B., G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil. 1981. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. Anal. Biochem. **116**:489-502.

10. **Garozzo, D., E. Spina, L. Sturiale, G. Montaudo, and R. Rizzo.** 1994. Quantitative determination of β -(1,2) cyclic glucans by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **8**:358-360
11. **Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1,2) glucans. *J. Bacteriol.* **169**:880-884.
12. **Hisamatsu, M.** 1992. Cyclic (1,2)- β -D-glucan (cyclosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**:137-146.
13. **Hisamatsu, M., T. Yamada, T. Higashiura, and M. Ikeda.** 1987. The production of acidic, o-acylated cyclosophorans [cyclic (1,2)- β -D-glucans] by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**:115-122.
14. **Kennedy, E. P.** 1987. Membrane-derived oligosaccharides. p. 672-679. *In* F. C. Neidhart, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
15. **Leigh, J. A., and G. C. Walker.** 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium meliloti*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63-67.
16. **Long, S. R., and B. J. Staskawicz.** 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell* **73**:921-935.
17. **Loubens I., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix and J.-P. Bohin.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329-340.
18. **Loubens, I., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohin.** 1993. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K12. p. 491-496. *In* M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph, and J. G. Swings (ed.), *Plant Pathogenic Bacteria*, Versailles, France, INRA Press, Paris.
19. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

20. **Miller, K. J., R. S. Gore, and A. J. Benesi.** 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**:4569-4575.
21. **Miller, K. J., R. S. Gore, R. Johnson, A. J. Benesi, and V. N. Reinhold.** 1990. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **172**:136-142.
22. **Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik, and G. Strecker.** 1986. Glycoproteins, p. 143-204 *In* M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate analysis: a practical approach*. IRL Press, Inc., Washington D.C.
23. **Mukhopadhyay, P., J. Williams and D. Mills.** 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **170**:5479-5488.
24. **Palleroni, N. J.** 1992. Present situation of the taxonomy of aerobic Pseudomonads, p. 105-115. *In* S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
25. **Palleschi, A., and V. Crescenzi.** 1985. On a possible conformation of cyclic β (1,2)-D-glucans. *Gazz. Chim. Ital.* **115**:243-245.
26. **Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet and G. Ricard.** 1984. A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**:41-47.
27. **Poppe, L., W. S. York, and H. Van Halbeek.** 1993. Measurement of inter-glycosidic ^{13}C - ^1H coupling constants in a cyclic β -(1,2)-glucan by ^{13}C -filtered 2D $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ ROESY. *J. Biomol. NMR* **3**:81-89.
28. **Puvanesarajah, V., F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, and E. W. Nester.** 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**:102-106.
29. **Rolin, D. B., P. E. Pfeffer, S. F. Osman, B. S. Szwergold, F. Kappler, and A. J. Benesi.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**:215-225.

30. **Serrano, A. M. G., G. Franco-Rodriguez, I. Gonzalez-Jiménez, P. Tejero-Mateo, J. M. Molina, J. A. Dobado, M. Megias, and M. J. Romero.** 1993. The structure and molecular mechanics calculations of the cyclic (1-2)- β -D-glucan secreted by *Rhizobium tropici* CIAT 899. *J. Mol. Struct.* **301**:211-226.
31. **Stahl, B., M. Steup, M. Karas, and F. Hillenkamp.** 1991. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **63**:1463-1466.
32. **Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin.** 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:6538-6544.
33. **Williamson, G., K. Damani, P. Devenney, C. B. Faulds, V. J. Morris, and B. J. H. Stevens.** 1992. Mechanism of action of cyclic β -(1,2)-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: competition between cyclization and elongation reactions. *J. Bacteriol.* **174**:7941-7947.
34. **York, W. S., J. U. Thomsen, and B. Meyer.** 1993. The conformations of cyclic (1-2)- β -D-glucans: application of multidimensional clustering analysis to conformational data sets obtained by Metropolis Monte Carlo calculations. *Carbohydr. Res.* **248**:55-80.

FIGURES

FIG. 1. Bio-Gel P-6 elution profile of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B). The column (1.6 x 60 cm) was eluted with 0.5 % acetic acid and aliquots were analyzed for total carbohydrates (see Materials and Methods). Results are expressed as equivalent glucose per milliliter of eluant. Fractions indicated by *horizontal bars* were lyophilized.

FIG. 2. Positive ion MALDI mass spectrum of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B). Mass assignments are based on an external calibration. For the most abundant ion, comparison of the theoretically calculated isotope pattern based on an $[M + Na]^+$ with the measured pattern is presented. A scale expansion by a factor 20 was also shown for the cell-associated glucans of *X. campestris*.

FIG. 3. HPAEC elution profile of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B) eluted as described in Materials and Methods. Oligosaccharides peaks were detected by pulsed amperometric detection. Peaks indicated by *horizontal bars* were collected, desalted and lyophilized, as described in Materials and methods.

FIG. 4. 600-Mhz ^1H NMR spectra of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B).

FIG. 5. ^{13}C -decoupled, ^1H -detected single quantum coherence ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC) spectra of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B).

FIG. 6. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ multiple bond correlation ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC) spectra of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B).

FIG. 7. Primary sequences of the cell-associated glucans of *B. solanacearum* (A) and *X. campestris* pv. citri (B). *Letters* denote the units in the NMR experiments.

TABLE 1. H-1 and H-2 proton chemical shifts of cell-associated glucans^a

Glucan	Proton	Chemical shift of each glucose residue															
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
<i>From B. solanacearum</i>																	
	H-1	5.175	5.092	5.059	5.037	5.023	4.935	4.935	4.925	4.915	4.913	4.903	4.891	4.656			
	H-2	3.658	3.716	3.633	3.639	3.712	3.360	3.594	3.699	3.749	3.562	3.694	3.725	3.672			
<i>From X. campestris</i>																	
	H-1	5.172	5.048	5.022	5.005	5.005	4.981	4.932	4.925	4.915	4.883	4.857	4.851	4.834	4.815	4.810	4.663
	H-2	3.633	3.577	3.539	3.615	3.541	3.534	3.553	3.586	3.329	3.645	3.704	3.690	3.667	3.682	3.722	3.644

^a Chemical shifts in ppm relative to acetone as internal reference.

TABLE 2. C-1 and C-2 carbon chemical shifts of cell-associated glucans^a

Glucan	Carbon	Chemical shift of each glucose residue															
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
<i>From B. solanacearum</i>																	
	C-1	99.48	101.77	102.29	102.00	102.18	103.32	103.30	102.94	103.41	103.54	102.71	102.64	104.52			
	C-2	83.43	82.36	83.36	85.17	80.91	74.86	83.48	81.01	82.42	84.80	80.55	79.96	81.97			
<i>From X. campestris</i>																	
	C-1	99.69	102.49	102.66	102.37	102.44	102.97	103.66	103.19	103.72	103.64	103.61	103.88	103.34	103.88	104.36	104.70
	C-2	83.35	84.29	84.77	83.02	84.34	85.62	84.76	83.88	74.93	83.08	80.77	81.16	81.39	81.05	82.02	83.44

^a Chemical shifts in ppm relative to acetone as internal reference

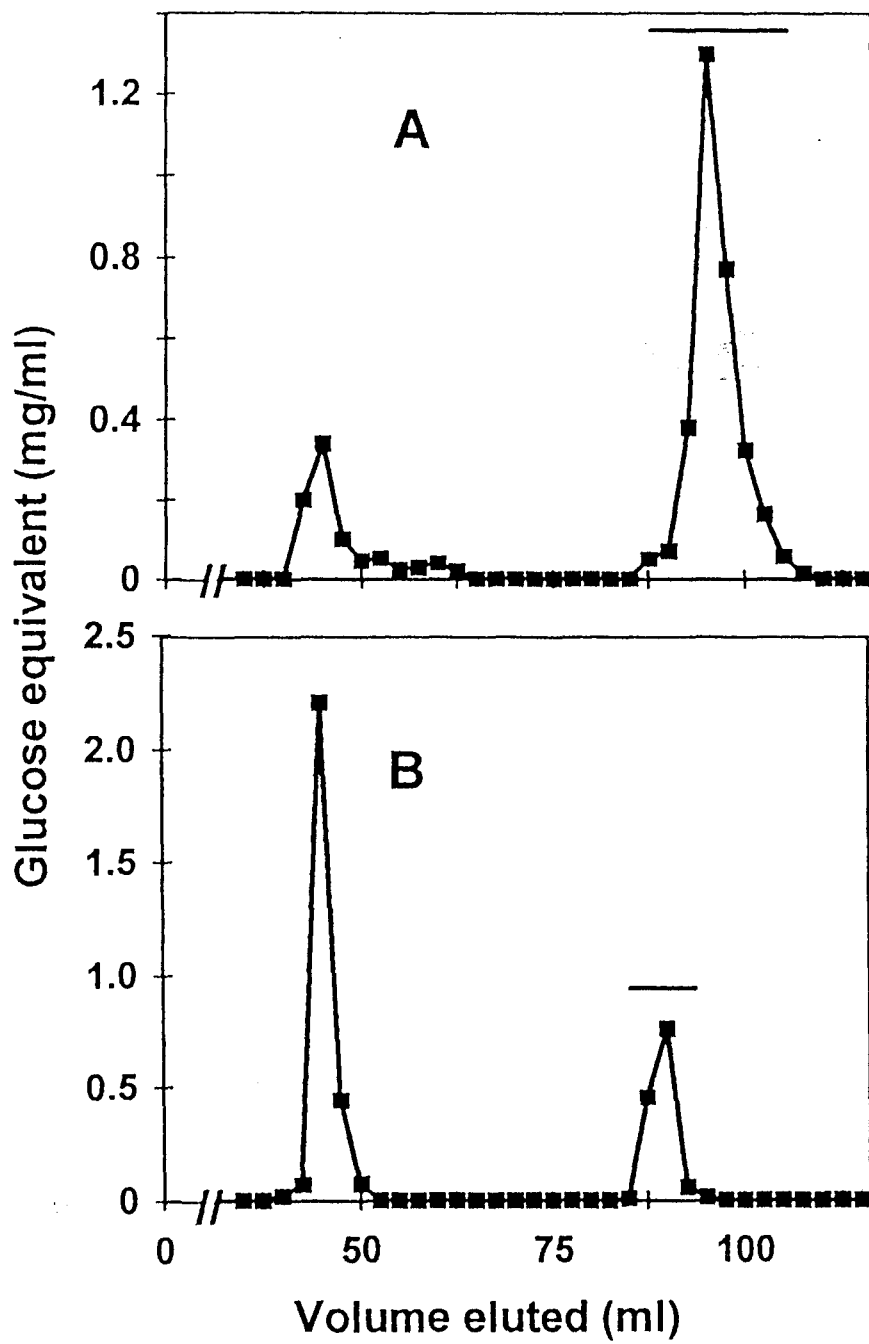


Figure 1. TALAGA *et al.*

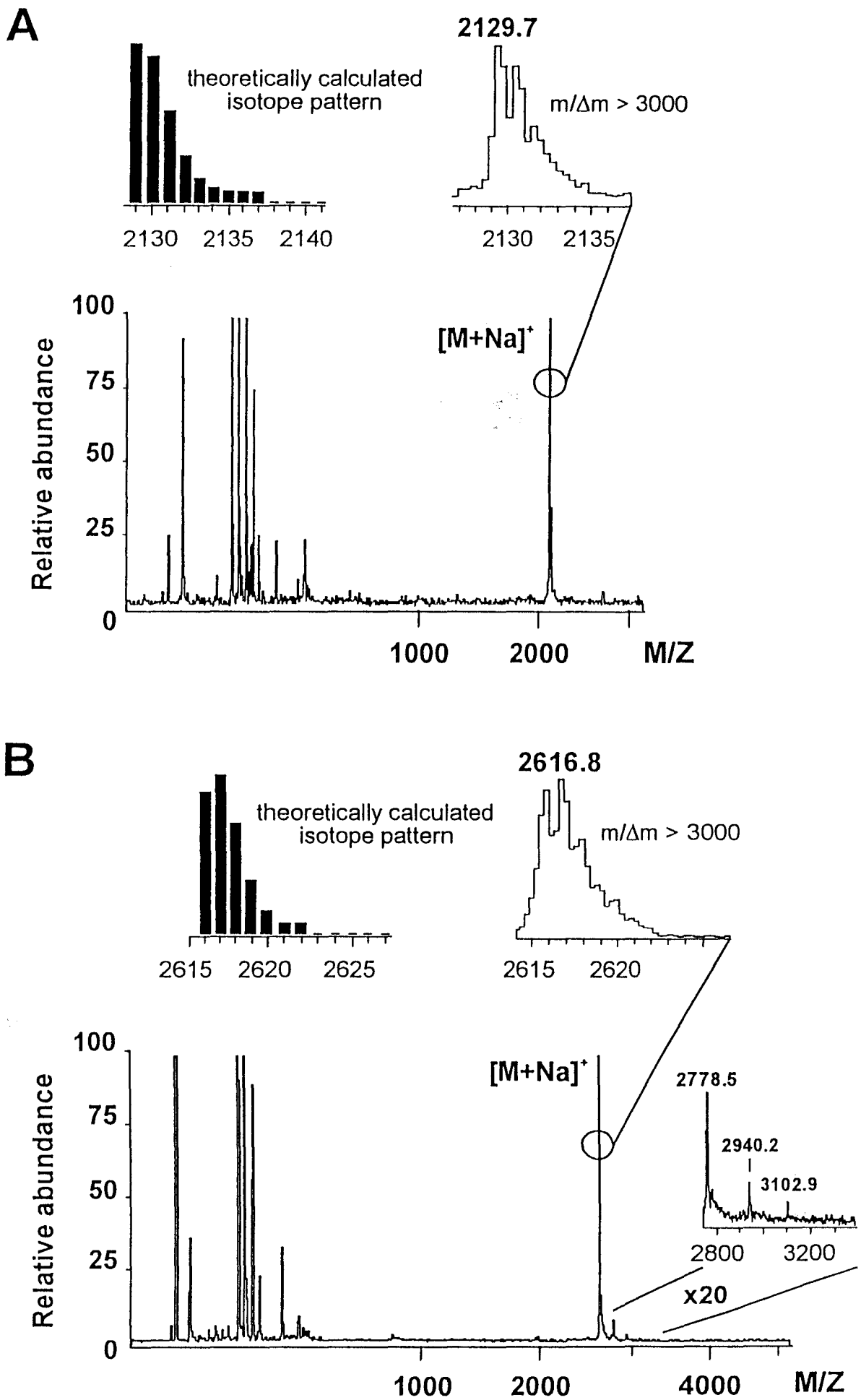


Figure 2. TALAGA *et al.*

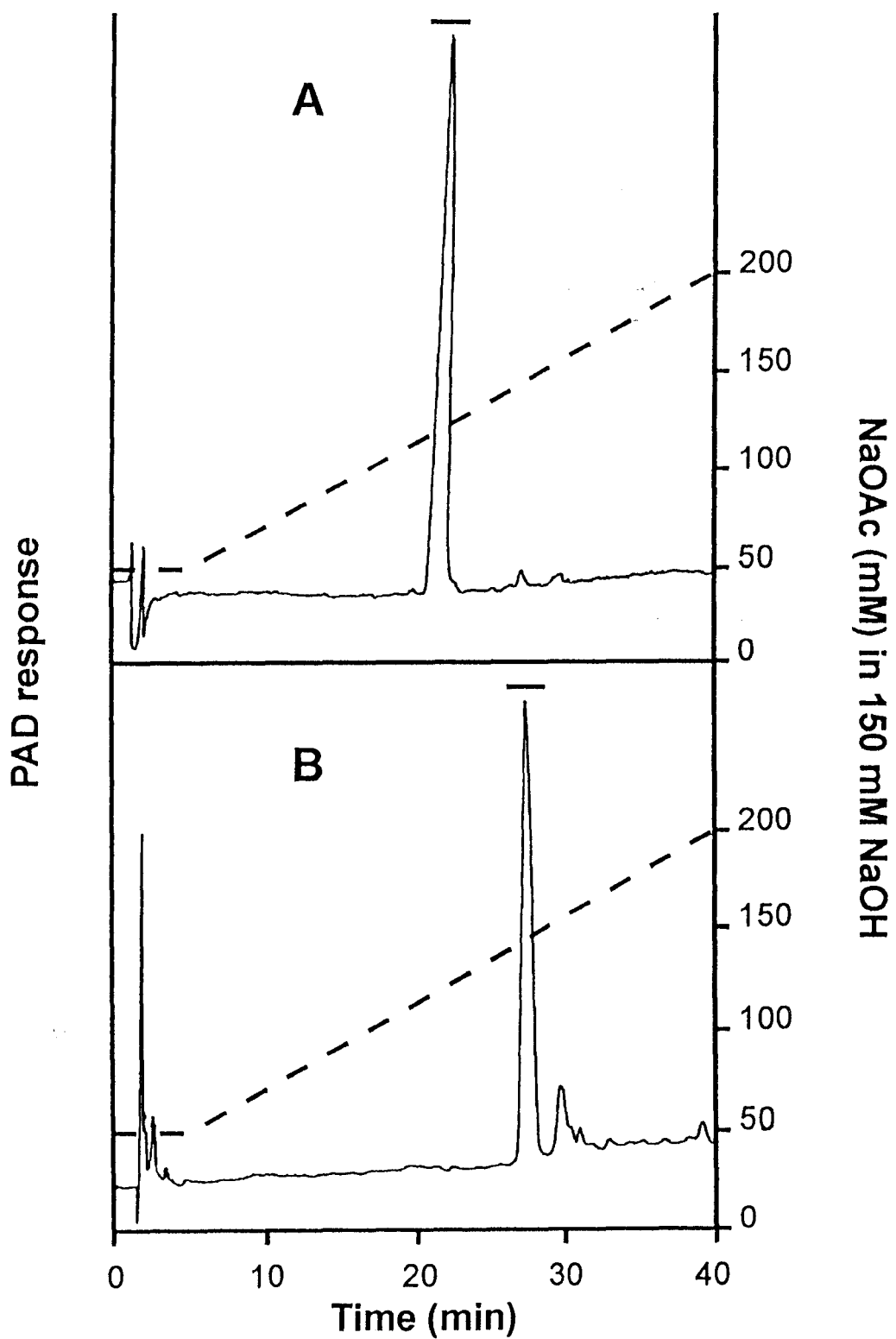
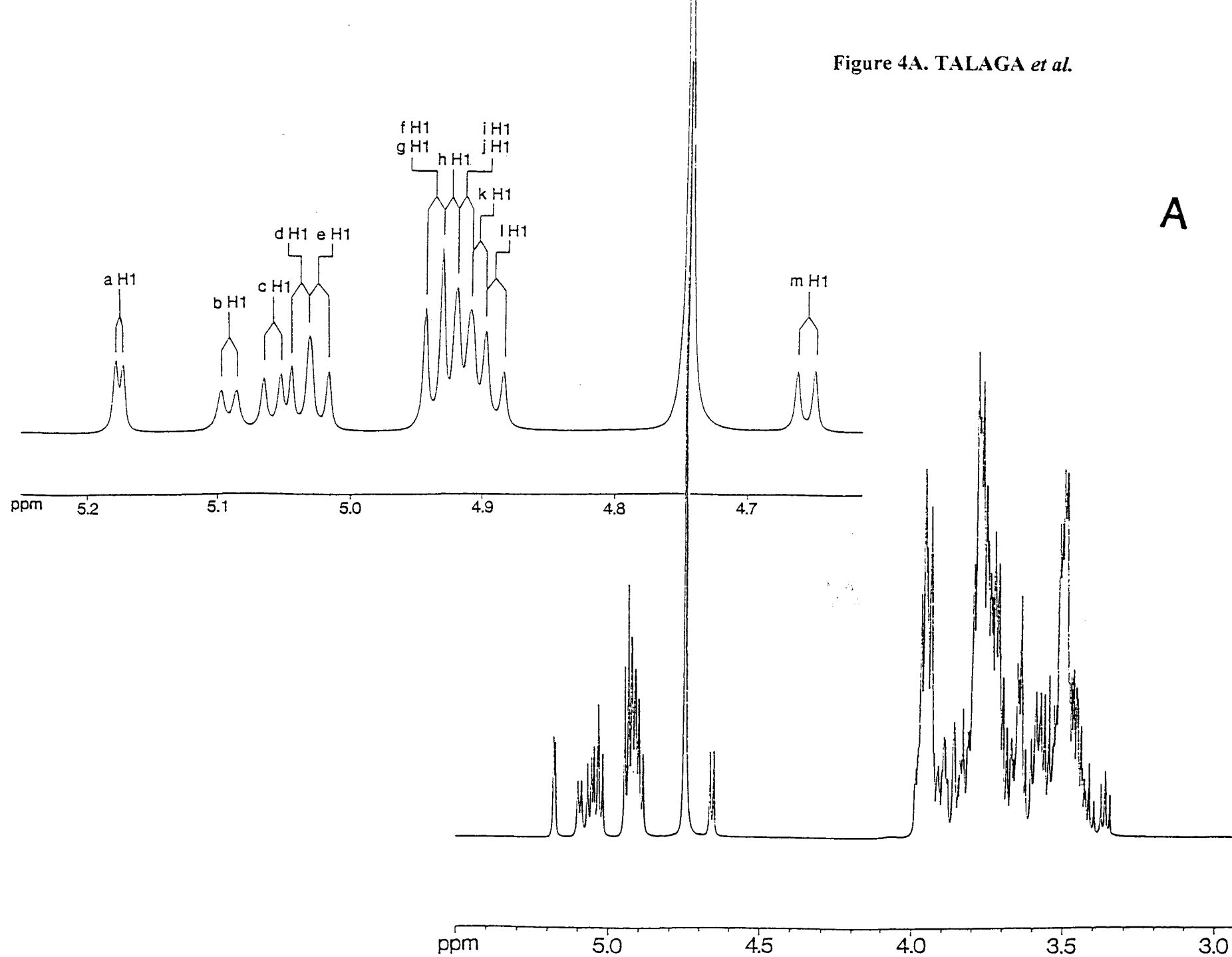


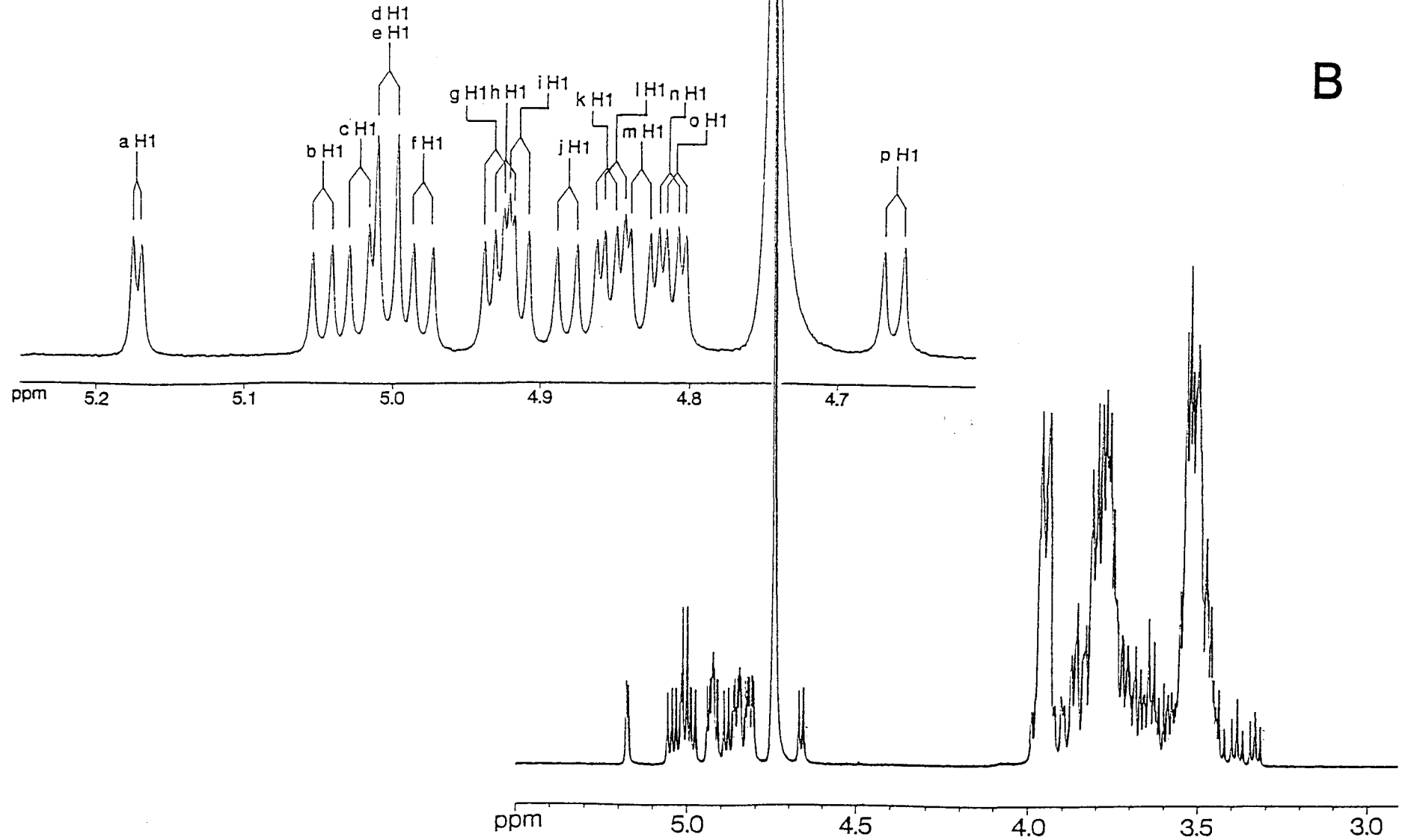
Figure 3. TALAGA *et al.*

Figure 4A. TALAGA *et al.*



A

Figure 4B. TALAGA *et al.*



B

Figure 5A. TALAGA *et al.*

A

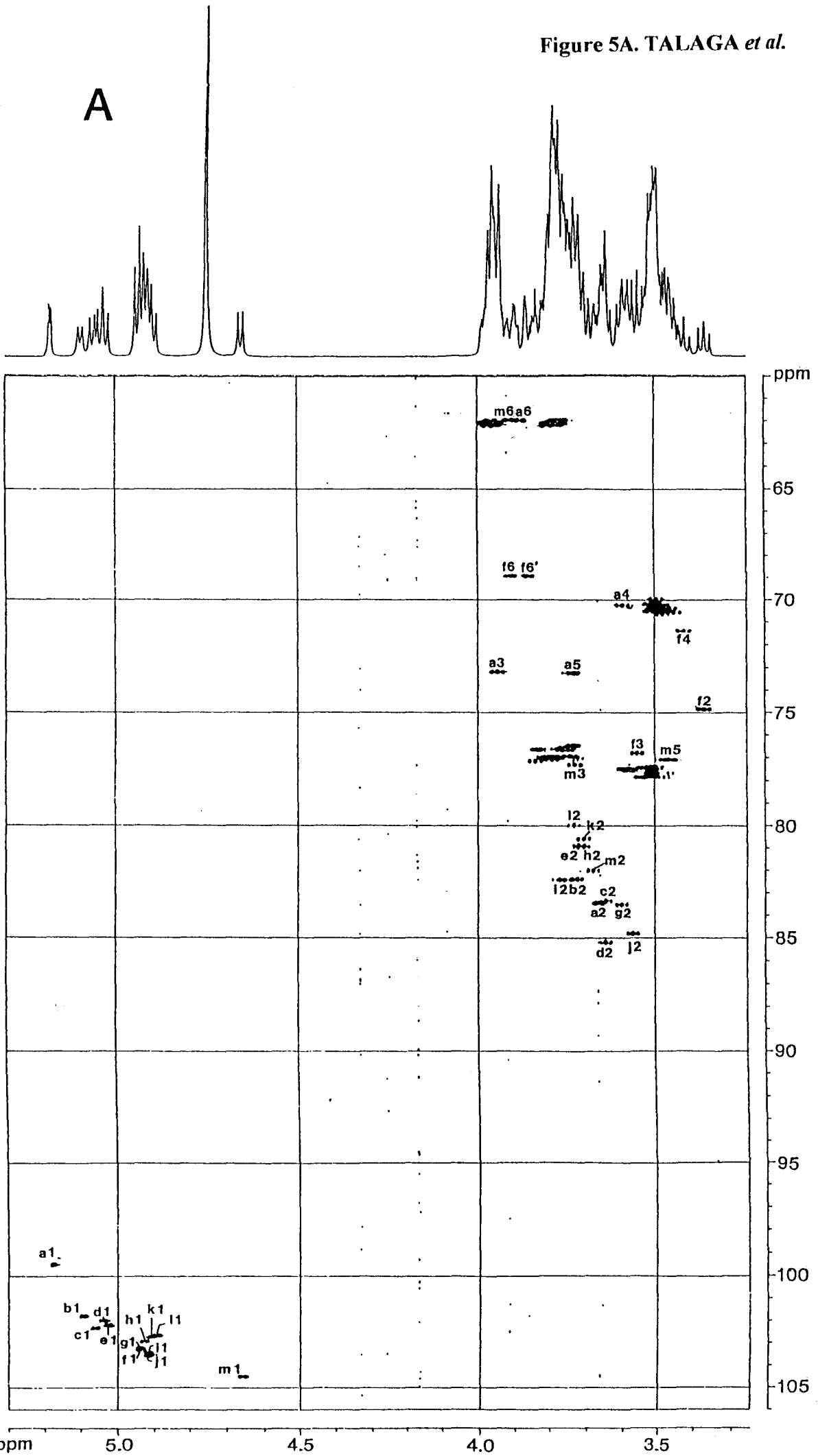
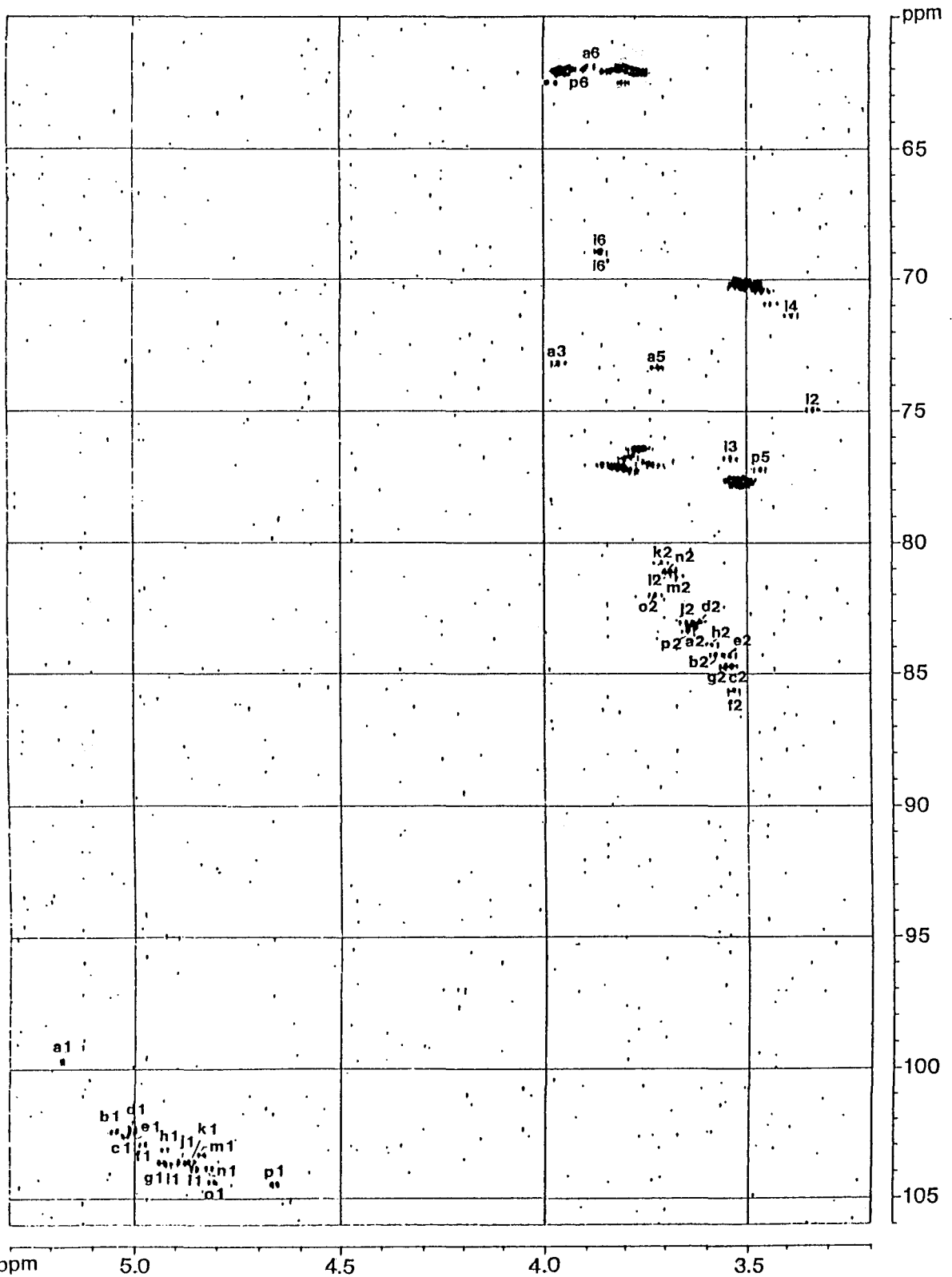
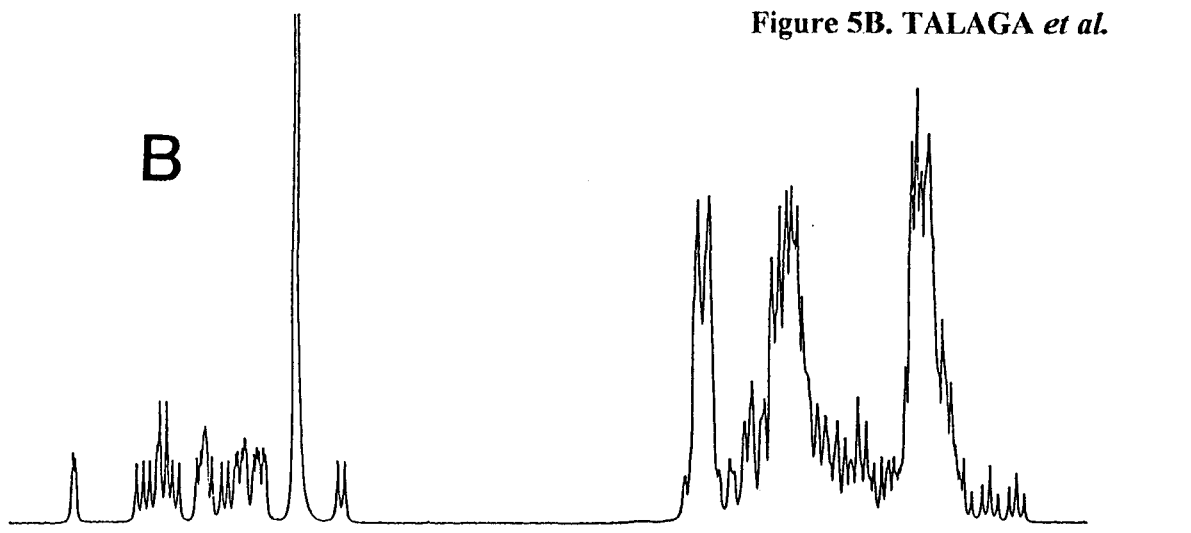


Figure 5B. TALAGA *et al.*

B



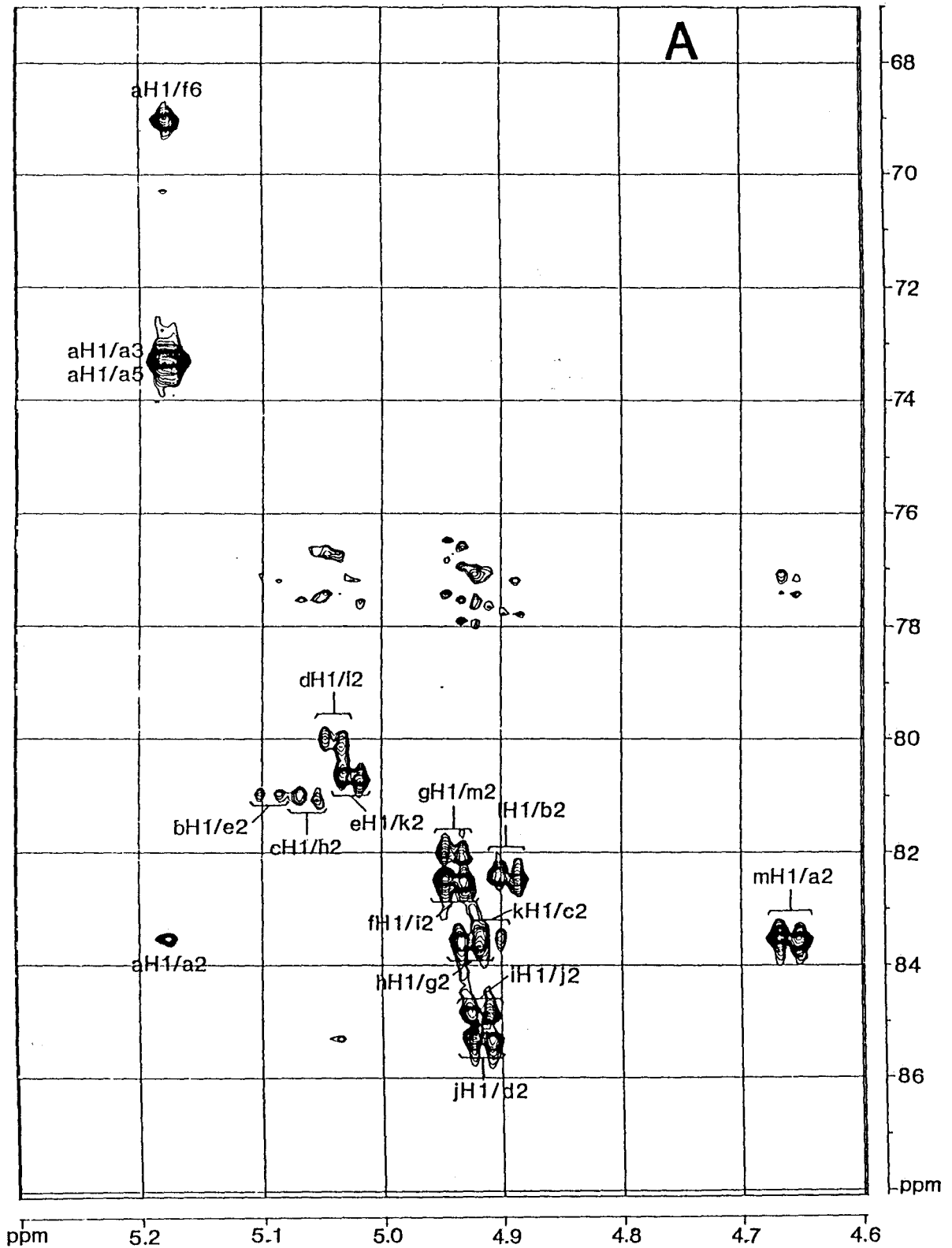


Figure 6A. TALAGA *et al.*

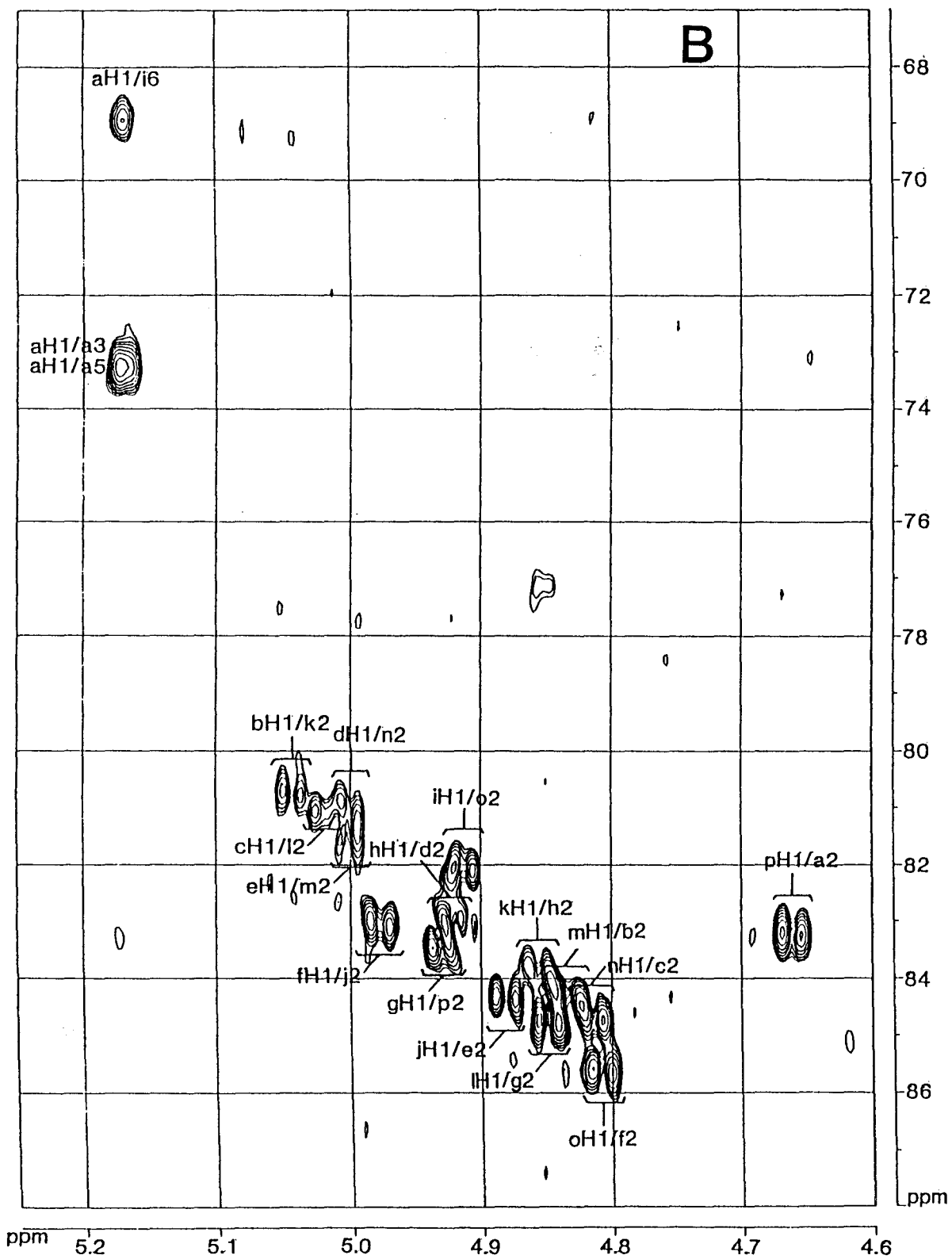


Figure 6B. TALAGA *et al.*

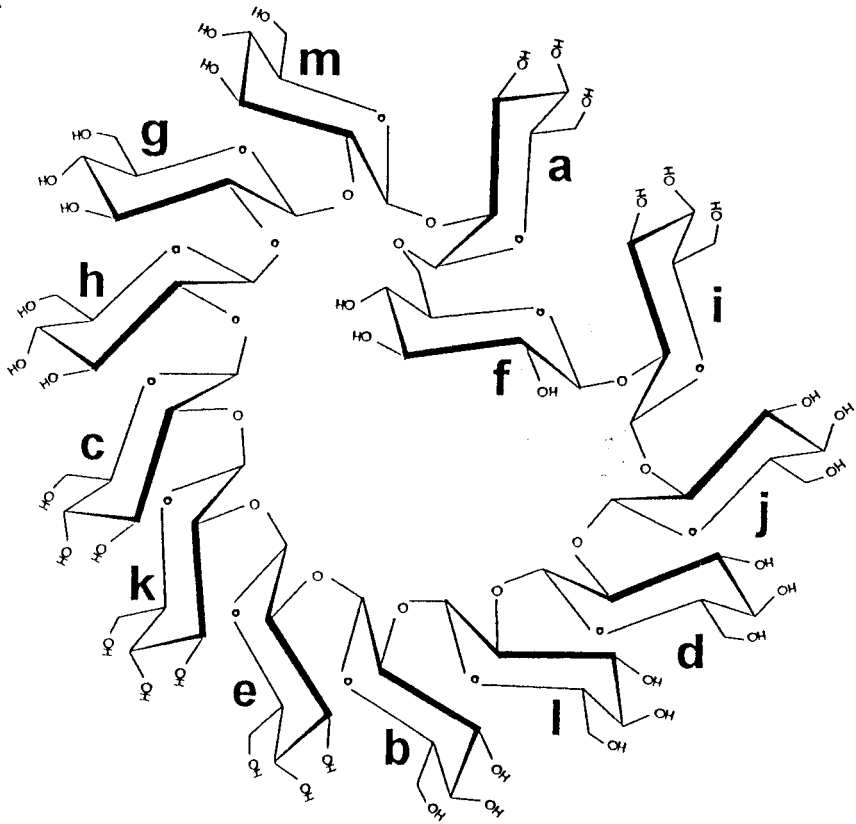
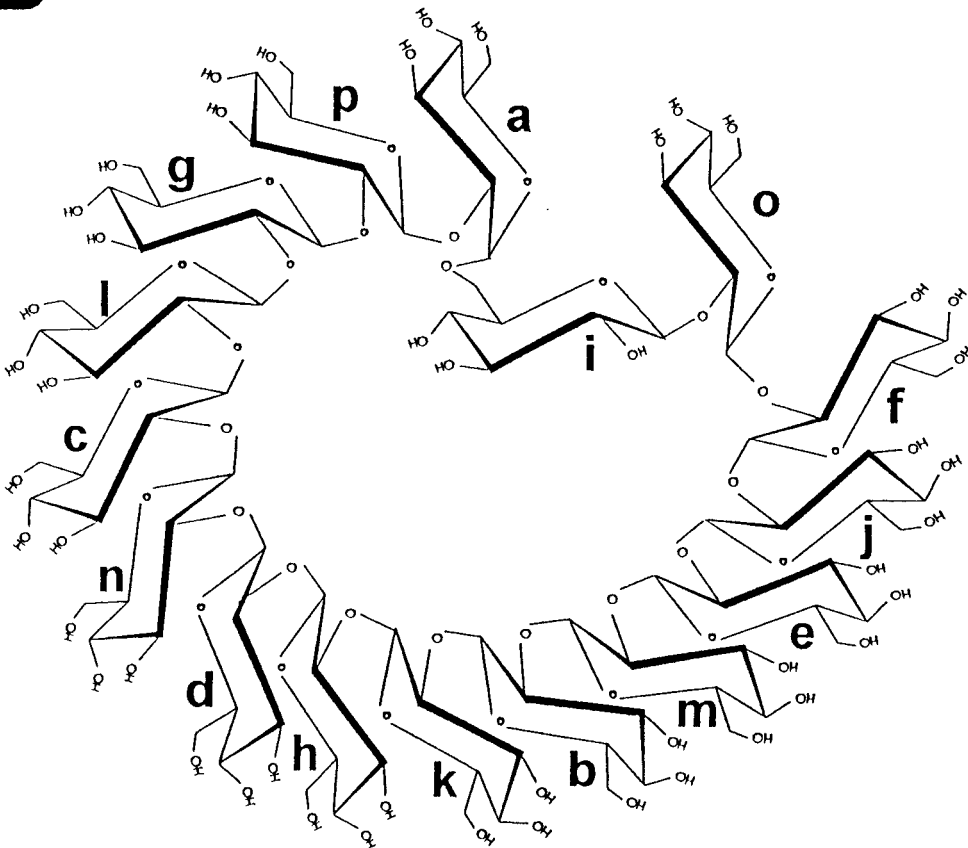
A**B**

Figure 7. TALAGA *et al.*

VI) Etude de la structure des OPG synthétisés par *Azospirillum brasilense*

A. brasilense est une bactérie isolée de la rhyzosphère de certaines plantes telles que le blé, le maïs, le riz, et la canne à sucre. Cette association entre cette bactérie fixatrice d'azote et les plantes ne conduit pas à la formation de structures différenciées. On parle alors d'associations symbiotiques. Des inoculations de diverses graminées par cette bactérie semblent produire des effets positifs sur la productivité des plantes hôtes. L'étude de la ou des glucosyl-transférase(s) responsable(s) de la synthèse des OPG chez cette bactérie a été rapportée récemment (Altabe et coll., 1994). Les OPG synthétisés par cette bactérie semblent être linéaires, et non cycliques comme ceux synthétisés par *B. japonicum*. Une collaboration s'est ouverte avec Sylvia Altabe en stage post-doctoral au laboratoire et Rodolfo Ugalde, de l'université de Buenos Aires en Argentine.

A) Purification et analyse par tamisage moléculaire

A. brasilense a été cultivée dans un milieu de faible osmolarité jusqu'en phase stationnaire. La chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 (figure 32) des OPG préalablement purifiés par la méthode à l'acide trichloroacétique montre la présence d'un seul pic contenant du matériel glucidique. Les fractions contenant ce matériel ont été groupées, dessalées et lyophilisées. La quantité d'OPG synthétisée est de 23 µg de glucose / mg de protéines.

B) Analyse par MALDI-MS et par RMN du proton

L'analyse par MALDI-MS en mode positif (matrice DHB) montre (figure 33) la présence de l'ion moléculaire $[M+Na]^+$ de masse 1966,7 qui correspond à celle attendue pour un glucane cyclique non substitué constitué de 12 résidus de glucose par molécule. L'ion moléculaire de masse 2066,9 correspond à celle de ce même glucane substitué par un résidu de succinate.

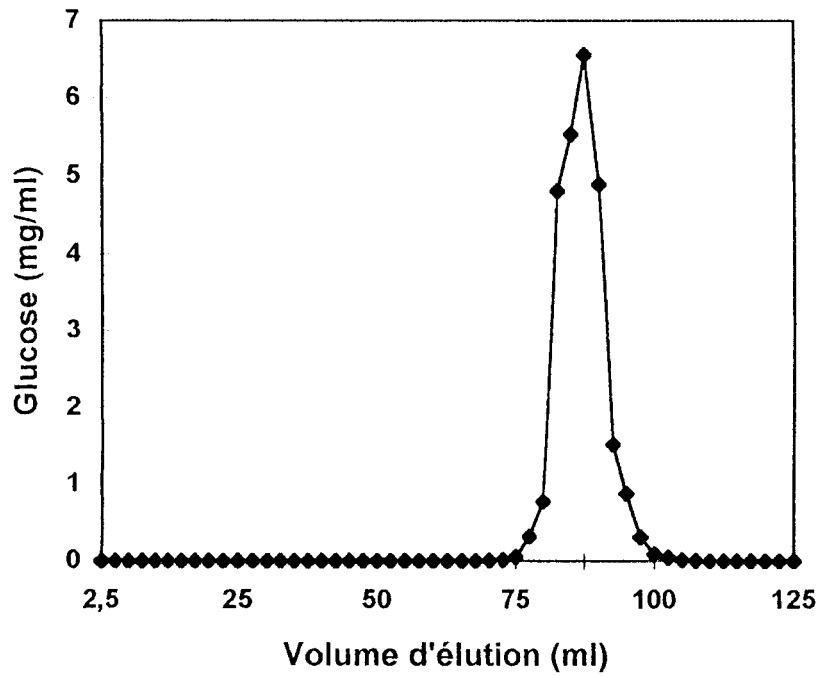


Figure 32 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 des OPG synthétisés par *A. brasilense*.

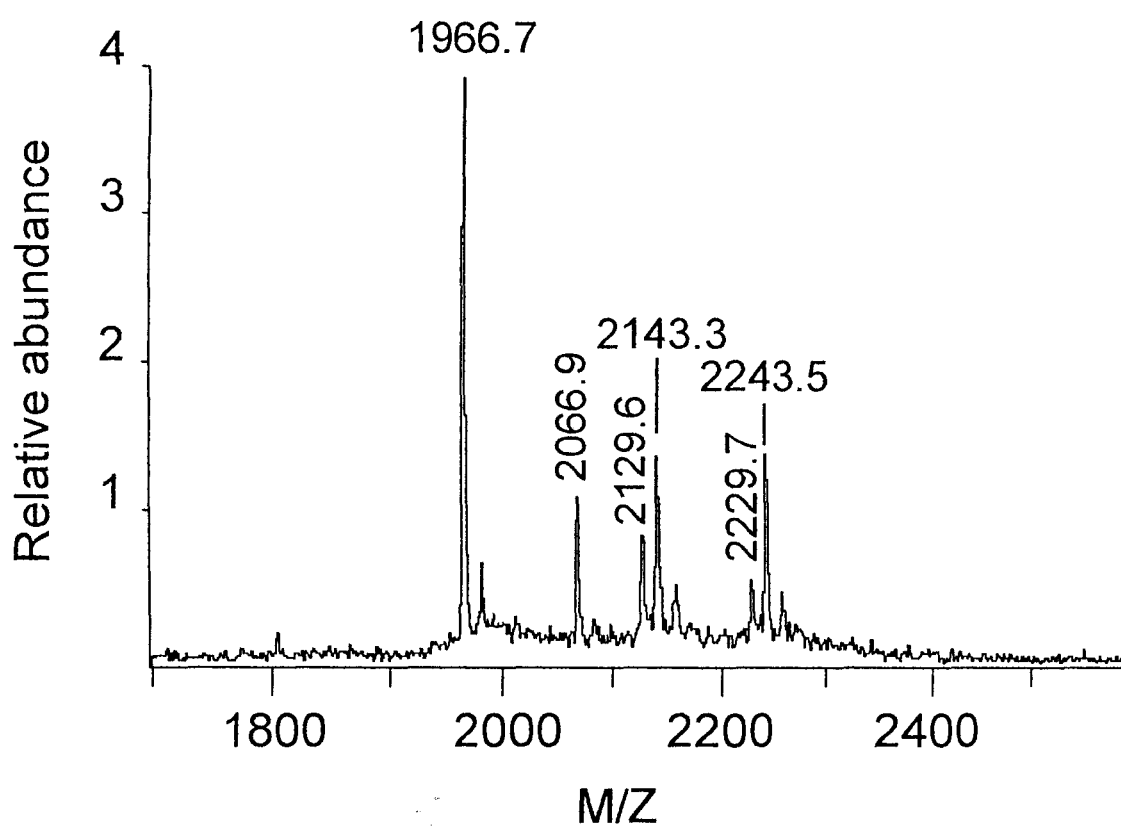


Figure 33 : analyse par spectrométrie de masse MALDI en mode positif (matrice DHB) des OPG synthétisés par *A. brasilense*.

Les ions moléculaires de masse 2129,6 et 2229,7 correspondent respectivement à un glucane cyclique constitué de 13 résidus de glucose par molécule non substitué et substitué par un résidu de succinate. L'ion moléculaire de masse 2143,3 peut correspondre à un glucane cyclique possédant 13 résidus de glucose par molécule et portant un groupement O-méthyl, ou à un glucane, linéaire ou cyclique, constitué de 12 résidus de glucose par molécule et portant un substituant de nature inconnue. L'ion de masse moléculaire 2243,5 correspond à ce même glucane substitué par un résidu de succinate.

L'analyse par RMN du ^1H à 400 MHz (figure 34), montre la présence des signaux à approximativement 2,55 et 2,70 ppm correspondant à ceux des CH_2 des résidus de succinate.

La présence du signal unique à approximativement 2,85 ppm montre la présence d'un groupement O-méthyl. Les signaux à approximativement 4,50 et 4,20 ppm correspondent respectivement aux protons anomériques des résidus de glucose engagés dans une liaison β -1,6 et des H-6 des résidus de glucose liés en β -1,6. Les protons anomériques à 4,65, 4,77 et 4,80 et 5,08 ppm correspondent à des résidus de glucose liés en configuration β ($J_{1,2}$ supérieures à 7 Hz). L'absence apparente de résidus de glucose en anomérie α semble indiquer qu'il n'existe pas d'extrémité terminale réductrice chez ces OPG. Toutefois, on peut noter la présence de signaux de faible intensité à approximativement 5,50 et 5,70 ppm qui peuvent correspondre, à l'étape actuelle de l'analyse, à la présence de contaminants.

C) Séparation des OPG désuccinylés par HPAEC

Préalablement à l'analyse, les OPG d'*A. brasilense* ont été soumis à un traitement alcalin afin d'éliminer les substituants succinate.

Cette analyse (figure 35) permet la séparation des OPG en trois composants majoritaires (pics I, II et III) qui ont été collectés et dessalés. Chacun de ces glucanes sera dénommé à l'avenir glucane I, glucane II et glucane III. Ces trois glucanes ont été analysés par RMN et spectrométrie de masse en mode MALDI.

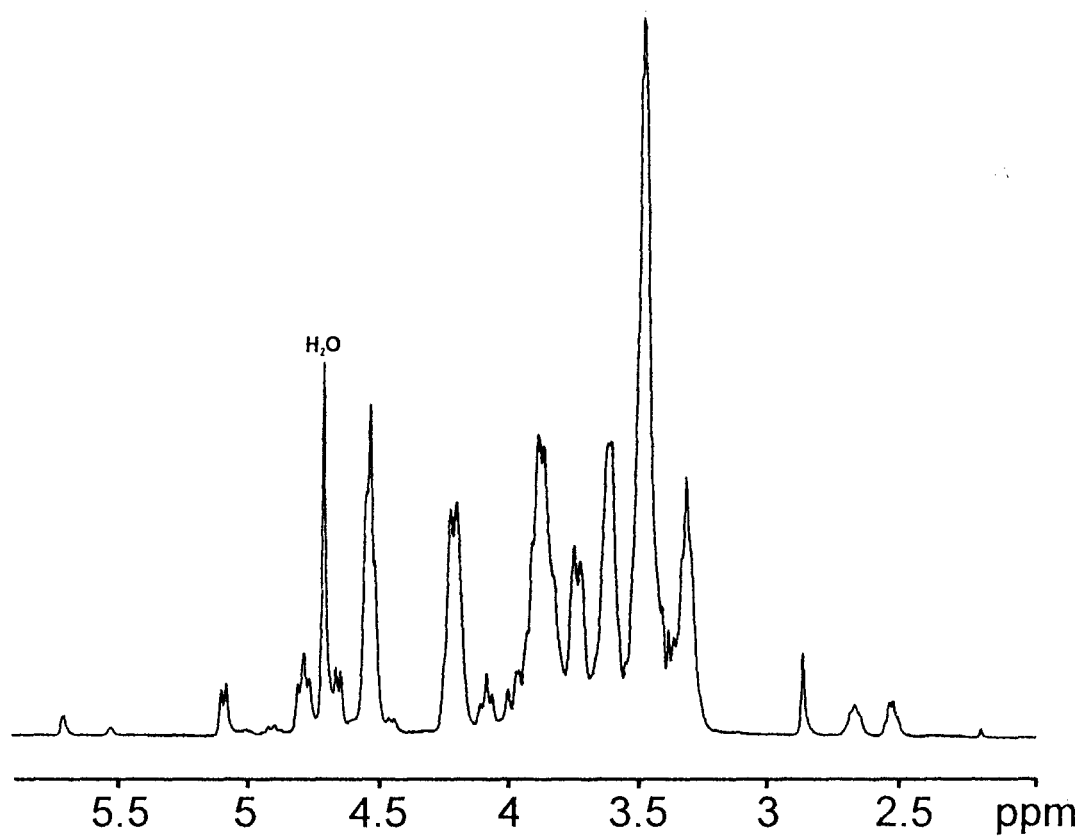


Figure 34 : analyse par RMN du proton à 400 MHz des OPG synthétisés par *A. brasilense*.

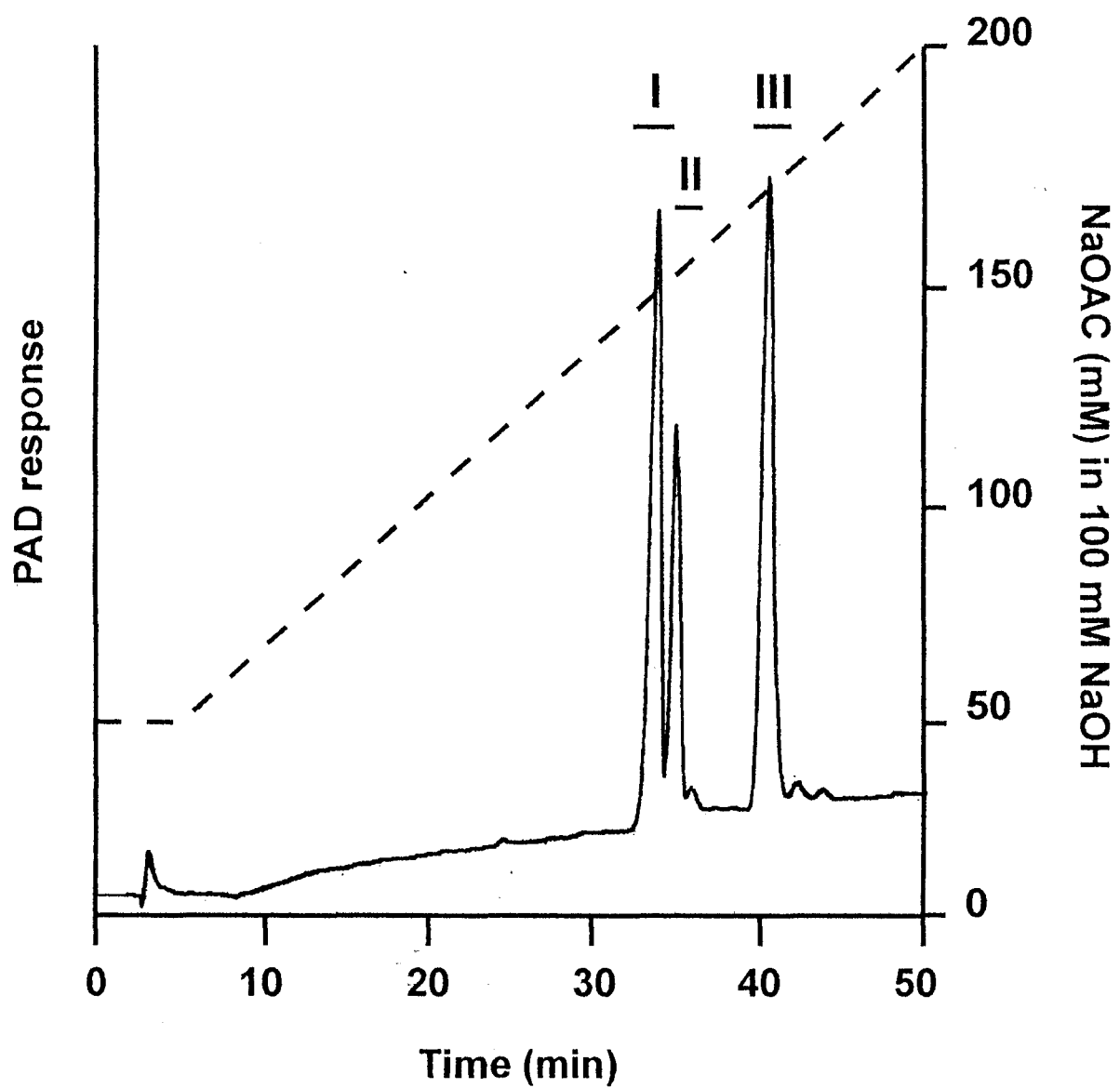


Figure 35 : séparation des OPG synthétisés par *A. brasilense* par HPAEC-PAD

D) Analyse par MALDI-MS de chacun des glucanes

L'analyse par MALDI-MS du glucane I (figure 36A) en mode positif (matrice DHB) montre la présence d'un ion moléculaire de masse $[M + Na]^+$ de masse 2143,5 qui correspond à l'ion moléculaire précédemment décrit lors de l'analyse des OPG globaux.

Le glucane II (figure 36B) et le glucane III (figure 36C) donnent respectivement par MALDI-MS des ions moléculaires de masse 2129,8 et 1967,1 qui correspondent à des glucanes cycliques constitués de 13 et de 12 résidus de glucose par molécule.

Il faut noter que, contrairement à ce qui se passe pour les OPG déjà décrits dans ce travail, le temps de rétention obtenu par l'analyse par HPAEC-PAD n'augmente pas avec le degré de polymérisation. En effet, dans le cas présent, c'est le glucane cyclique constitué de 12 résidus de glucose par molécule qui possède le temps de rétention le plus grand. Ce phénomène avait déjà été observé par Koizumi et coll. (1988) qui ont montré que l'ordre d'éluion des glucanes cycliques liés en β -1,2 possédant 20 et 21 résidus de glucose par molécule est inversée. Ces auteurs ne donnent aucunes explications à ce phénomène.

E) Analyse par RMN de chacun des glucanes

L'analyse par RMN du 1H à 300 MHz des trois glucanes (figures 37) révèle la présence chez les trois glucanes des signaux à 4,65, 4,77, 4,80 et 5,08 ppm. Ces signaux correspondent à ceux de protons anomériques en anomérie β . La présence de liaisons β -1,6 au sein de ce glucane peut être montrée par la présence des signaux à approximativement 4,50 et 4,20 ppm. On constate que les glucane I (figure 37A) et II (figure 37B) possèdent respectivement des signaux à 5,65 et 5,39 ppm qui correspondent à ceux d'un proton anomérique α . De plus, c'est le glucane I qui porte le groupement O-méthyl (signal à 2,85 ppm), confirmant l'analyse par MALDI-MS. La présence dans le glucane II de ce même signal semble correspondre à une contamination par le glucane I lors de la collecte. Le glucane III semble être l'OPG le « plus simple » produit *par A. brasilense*. Cette bactérie semble être capable de rajouter un résidu de glucose en anomérie α sur cet OPG (formation du glucane II). Le glucane I résulte de l'ajout d'un groupement O-méthyl sur le glucane II, vraisemblablement sur le résidu en α , comme le montre le déplacement chimique du proton anomérique de ce résidu déplacé vers les bas champs.

Afin de mieux comprendre la structure de ces composés, l'étude du glucane III a été entreprise par RMN homonucléaire (COSY, COSY simple relai et COSY double relai), et hétéronucléaire (HMQC).

L'étude par COSY du glucane III m'a permis d'attribuer différents protons de la molécule. J'ai dénommé **a-l** les différents résidus de glucose en fonction de l'ordre décroissant du déplacement chimique de leur proton anomérique (tableau 11). La corrélation de ces fréquences proton avec celle du carbone qui leur est attaché dans le spectre HMQC a permis l'attribution de quelques carbones (tableau 12 et figure 38).

On constate que les C-3 des résidus **a**, **e**, et **b** possèdent des déplacements chimiques qui sont déplacés vers les bas champs. Ces résidus possèdent donc leurs C-3 engagés dans une liaison glycosidique en β -1,3. Les autres résidus, quant à eux, sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,6. On détermine donc seulement trois résidus liés en β -1,3, alors que Rolin et coll. (1992) proposaient (figure 11), pour les glucanes cycliques liés en β -1,6 et β -1,3 de *B. japonicum*, un nombre de 6 résidus de glucose liés en β -1,3. Hors, ces auteurs avaient présenté des spectres fortement similaires à ceux que nous avons obtenu pour le glucane III. La structure proposée par Rolin semble donc être fausse.

De plus, grâce à la séparation des différentes molécules composant les OPG d'*A. brasilense* par HPAEC-PAD, nous avons pu montrer la présence de glucane possédant une liaison α , chose qui n'avait jamais été trouvée chez les OPG liés en β -1,3 et β -1,6 précédemment décrits. La chromatographie préparative par HPAEC-PAD permet donc d'obtenir une meilleure séparation. Il conviendra à l'avenir de déterminer l'ordre séquentiel de chacun des résidus de glucose à l'aide des analyses par HMBC, NOESY, HSQC-TOCSY et HSQC-NOESY. L'établissement de cette séquence primaire pour le glucane III nous permettra de déterminer celles des glucanes I et II.

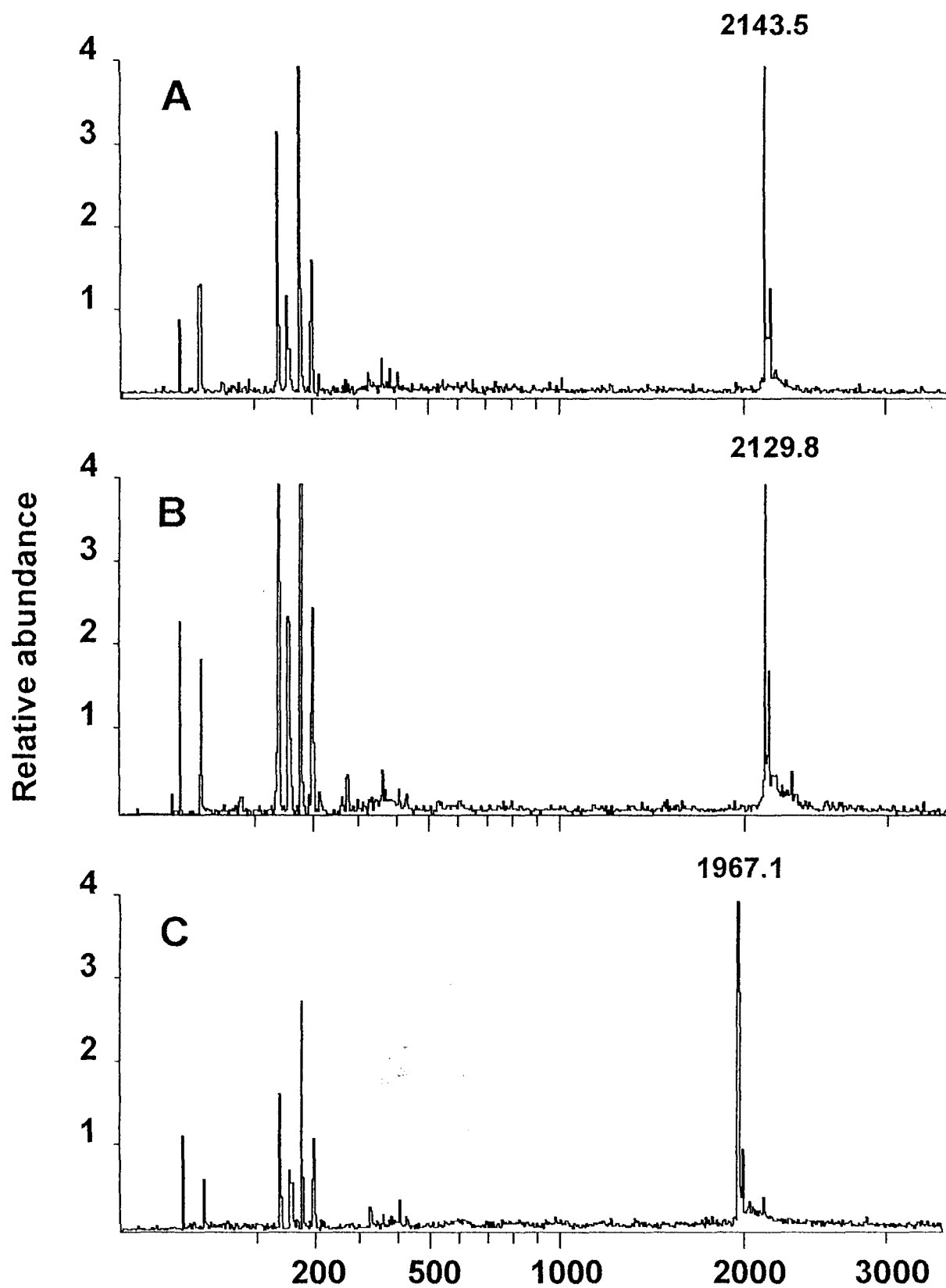


Figure 36 : analyse par MALDI-MS en mode positif (matrice DHB) des glucanes I (A), II (B) et III (C).

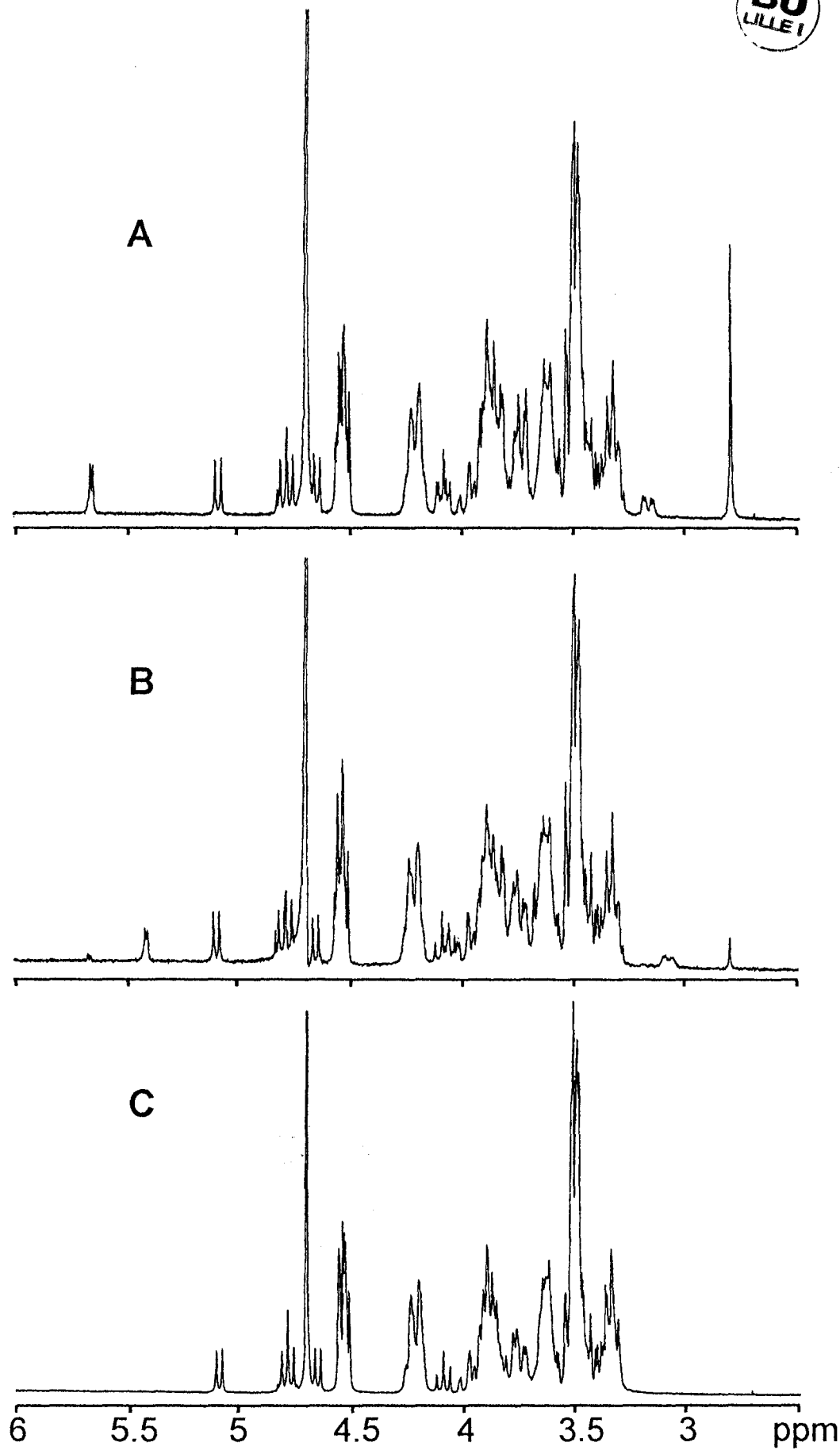


Figure 37 : analyse par RMN du proton à ¹H à 300 MHz des glucanes I (A), II (B) et III (C).

Résidus	Protons						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
a	5.083	3.552	3.805	3.501	ND	ND	ND
b	4.799	3.616	4.093	3.890	ND	ND	ND
c	4.771	3.375	3.544	3.509	ND	ND	ND
d	4.646	3.387	3.496	3.412	ND	ND	ND
e	4.51-4.56	3.521	3.750	3.621	ND	ND	ND
f-l	4.51-4.56	3.32-3.35	3.49-3.51	3.45-3.50	3.60-3.50	4.25-4.30	3.85-3.90

Tableau 11 : déplacements chimiques des protons du glucane III. ND ; non déterminé.

Résidus	Carbones					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
a	102.58	ND	85.70	ND	ND	ND
b	103.91	ND	79.83	74.44	ND	ND
c	103.99	ND	ND	ND	ND	ND
d	102.31	ND	ND	ND	ND	ND
e	104.10-104.45	ND	85.57	ND	ND	ND
f-l	104.10-104.45	74.2-74.6	76.7-77.1	70.5-71.0	76.0-76.4	70.1-70.3

Tableau 12 : déplacements chimiques des carbones du glucane III. ND ; non déterminé.

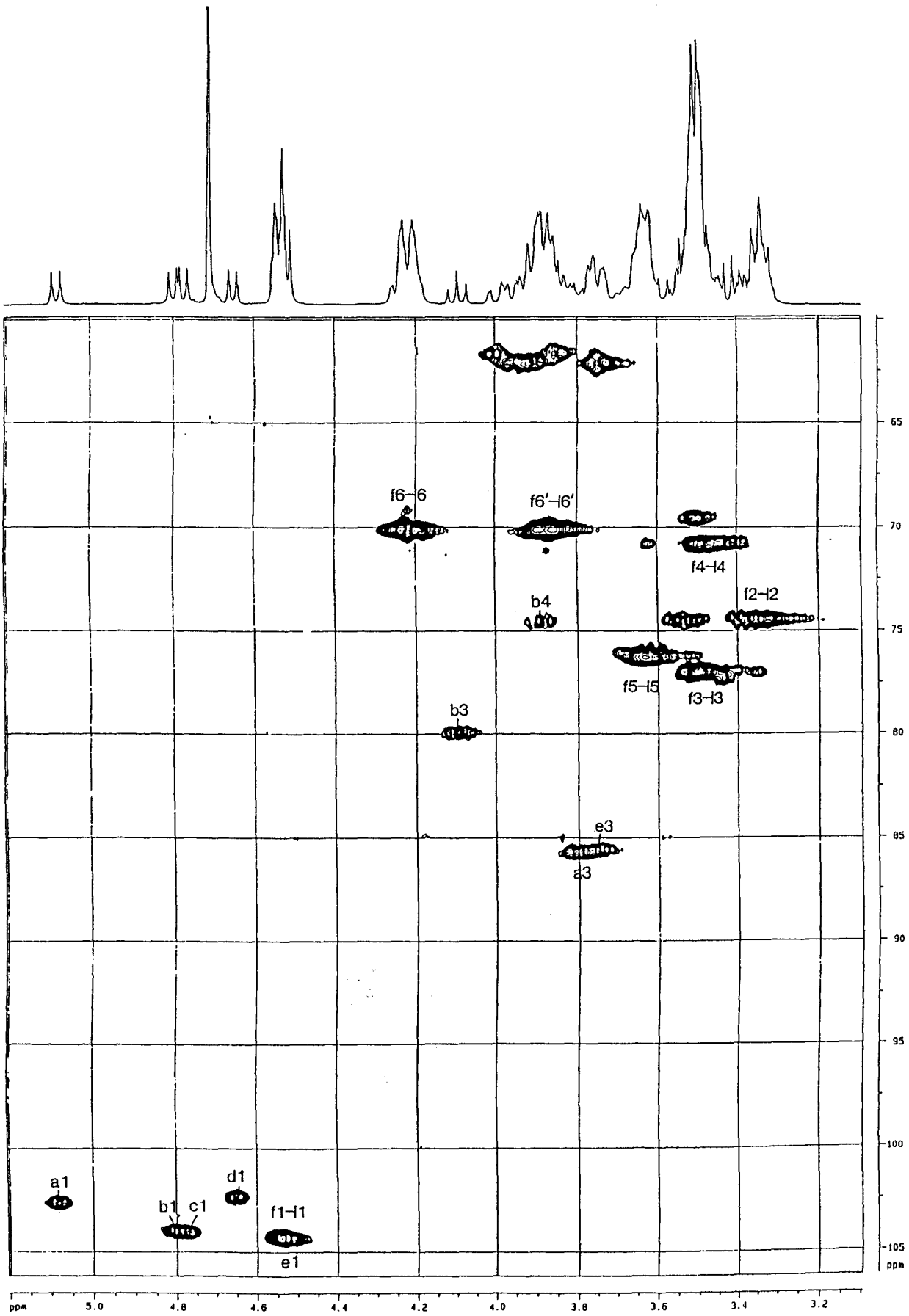


Figure 38 : spectre HMQC du glucane III.

VII) Etude de la structure des glucanes associés à *Rhodobacter sphaeroides*.

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie photosynthétique facultative qui fait partie, comme les *Rhizobiaceae*, du groupe alpha des protéobactéries. Après une réduction de la pression partielle en oxygène, une série d'invaginations de la membrane cytoplasmique permet la formation de membranes intracytoplasmiques, spécialisées dans une photosynthèse anoxygénique. La structure de l'enveloppe de ces bactéries est donc fortement modifiée dans ces conditions. Cette bactérie de l'eau n'est pas pathogène.

A) Purification et analyse par tamisage moléculaire

R. sphaeroides est cultivé dans un milieu de faible osmolarité et la figure 39 montre la chromatographie par tamisage moléculaire sur Biogel-P4 de l'extrait obtenu par la méthode à l'acide trichloroacétique. Les fractions comprises entre 60 et 80 ml, contenant les oligosaccharides, ont été groupées et lyophilisées. La quantité de glucanes synthétisés est de 30 µg de glucose / mg de protéines.

B) Analyse par MALDI-MS et par RMN du proton

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des oligosaccharides réduits associés à *R. sphaeroides* nous montre que les oligosaccharides ne sont composés que de glucose et qu'ils sont dépourvus d'extrémité terminale réductrice. Ce résultat est confirmé par l'analyse par MALDI-MS (figure 40) en mode positif (matrice AQU) qui montre la présence de l'ion moléculaire $[M + Na]^+$ de masse 2939,3 qui correspond à la masse attendue pour un glucane cyclique non substitué constitué de 18 résidus de glucose par molécule. Les ions moléculaires $[M + Na]^+$ de masses 3040,1, 3139,5, 3239,5, 3339,6, 3439,9, 3539,5, 3639,6 correspondent à ce même glucane substitué respectivement par 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 résidus de succinate par molécule. L'analyse est compliquée par le fait que ces molécules multi substituées peuvent également former des ions moléculaires $[M + K]^+$, $[M - H + K + Na]^+$, $[M - 2H + 2K]^+$, et $[M - 2H + 2K + Na]^+$ (figure 40).

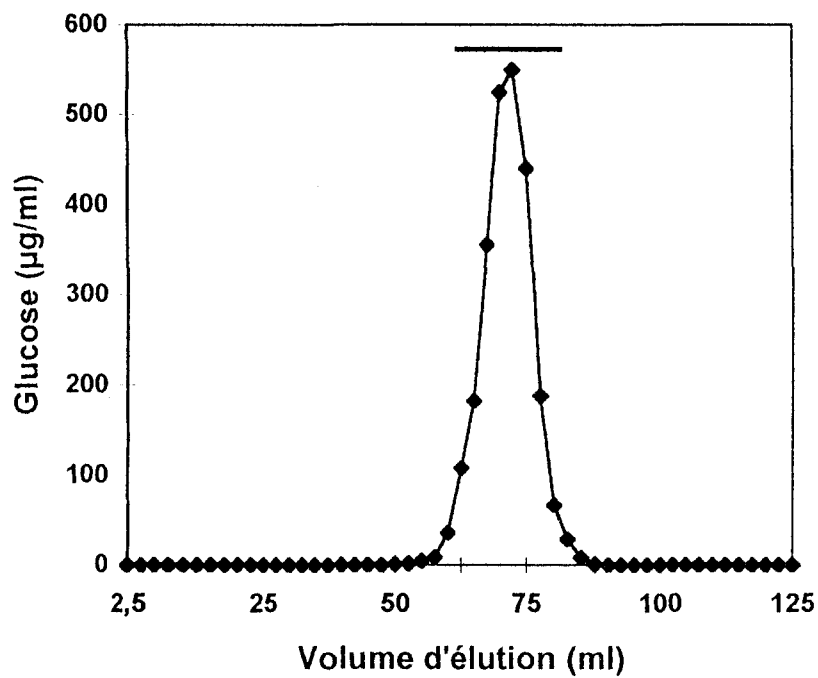


Figure 39 : chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel-P4 des OPG synthétisés par *R. sphaeroides*.

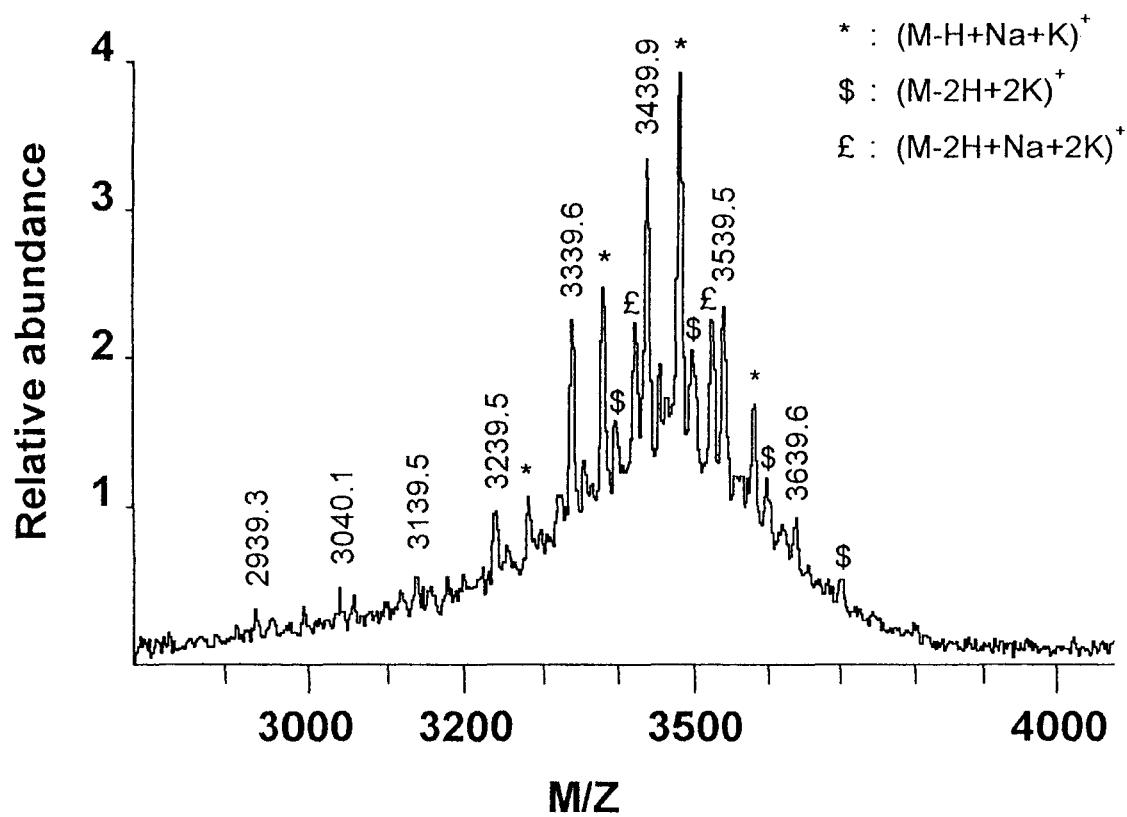


Figure 40 : spectre de masse MALDI obtenu en mode positif (matrice AQU) des glucanes synthétisés par *R. sphaeroides*.

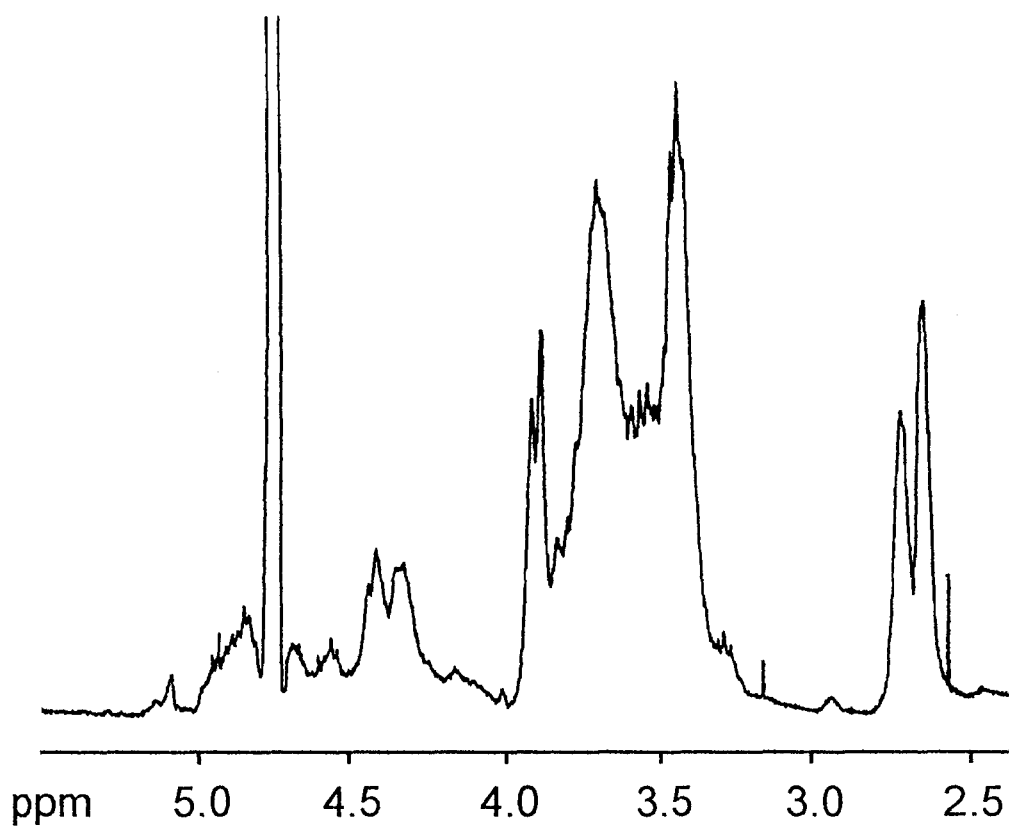


Figure 41 : spectre RMN du ^1H à 400 MHz des glucanes synthétisés par *R. sphaeroides*.

La substitution par les résidus de succinate est confirmée par l'analyse par RMN du proton (figure 41) avec la présence des signaux à approximativement 2,65 et 2,71 ppm. De plus, l'intensité de ces signaux nous montre clairement que les glucanes de *R. sphaeroides* sont substitués par un grand nombre de ces résidus, confirmant l'analyse par MALDI-MS.

C) Analyse par RMN des glucanes désuccinilés

Les glucanes ont été soumis à un traitement alcalin, ceci afin d'éliminer tous les substituants par les résidus de succinate. L'analyse par MALDI-MS du produit dépourvu de ces résidus montre la présence majoritaire d'un ion moléculaire de masse $[M + Na]^+$ 2939,4 qui correspond à un glucane cyclique possédant 18 résidus de glucose par molécule. Afin de compléter la purification, j'ai séparé le glucane majoritaire par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à haut pH (figure 42). Le pic majoritaire obtenu, possédant un temps de rétention de 27 minutes, a été collecté, dessalé et analysé par RMN homonucléaire et hétéronucléaire à 600 MHz.

1) Analyse par RMN du proton

Dans le spectre 1H , les différents résidus de glucose ont été dénommés **a-r** en fonction de l'ordre décroissant du déplacement chimique des protons anomériques des 18 résidus de glucose composant la molécule (figure 43). La constante de couplage $J_{1,2}$ du résidu **a** de 3,4 Hz révèle son anomérie α . Les 17 autres résidus de glucose (**b-r**) possèdent une constante de couplage $J_{1,2}$ supérieure à 7,6 Hz qui révèle l'anomérie β des ces résidus.

2) Analyse par RMN homonucléaire

La figure 44 illustre le spectre COSY et la figure 45 le spectre TOCSY obtenus pour ce glucane. Le spectre COSY nous permet d'attribuer sans ambiguïté les différents H-1 et H-2 de chacun des résidus de glucose (figure 44). Toutefois, le spectre TOCSY montre que les différents protons présentent de nombreux recouvrements, ce qui empêche l'attribution totale. Seuls tous les protons des résidus **a**, **i** et **r** peuvent être déterminés (figure 45).

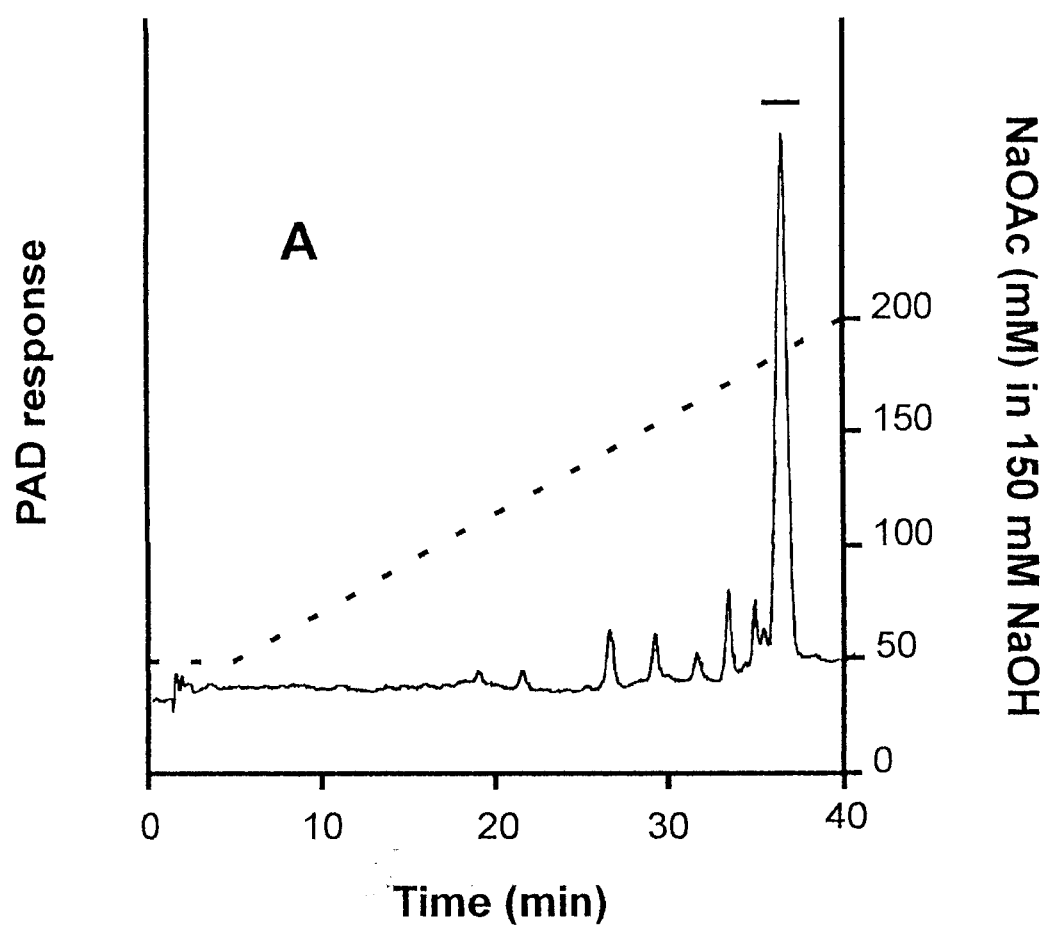


Figure 42 : chromatographie à haute performance d'échanges d'anions à haut pH des OPG désubstitués synthétisés par *R. sphaeroides*.

3) Analyse par RMN hétéronucléaire

Les attributions des H-1 et des H-2 permettent d'attribuer les C-1 et les C-2 de tous les résidus à partir du spectre HSQC (figure 46). Certains carbones des résidus **a**, **i**, et **r** ont pu être attribuer (figure 46). On constate que le C-2 du résidu **i** est déplacé vers les hauts champs et que son C-6 est déplacé vers les bas champs (~ 7 ppm). Ceci indique clairement que ce résidu porte un hydroxyle libre sur son C-2 et que son C-6 est engagé dans une liaison glycosidique. De plus, l'absence de pics de corrélation entre 92 et 96 ppm confirme le caractère cyclique du glucane. L'étape suivante est d'établir la séquence primaire de ce glucane à partir du spectre HMBC (figure 47). Toutefois, ceci primaire n'est pas possible totalement. En effet, on constate que les H-1 des résidus **d** et **e** donnent deux pics de corrélation confondus. De plus, les résidus **j-q** donnent des pics de corrélation qui sont tous présents dans une zone très étroite du spectre. Il convenait donc d'établir la séquence primaire à partir de l'analyse par HSQC-TOCSY (figure 48) et HSQC-NOESY (figure 49) de ce glucane. Le spectre HSQC-TOCSY nous permet l'attribution tous les carbones, ainsi que la majorité des protons composant tous les résidus de glucose. Par exemple, le H-2 du résidu **a** est trouvé à 3,621 ppm dans la dimension ^1H du **aC-1**, et le C-2 est identifié à 83,55 ppm dans la dimension ^{13}C du **aH-1**. De même, les protons H-3, H-4, H-5, H-6 et H-6' peuvent être identifiés à respectivement 3,947, 3,534, 3,534, 3,711, 3,880, et 3,786 ppm dans la dimension ^1H du **aC-3** et **aC-5**. Les attributions de presque tous les protons et de tous les carbones ainsi obtenus sont résumés respectivement dans les tableaux 13 et 14.

Le spectre HSQC-NOESY montre que les H-1 des résidus **b-q** donnent des pics de corrélation avec leurs propres C-3 et C-5. Ceci confirme l'anomérie β de ces glucopyranosides. Par contre, le H-1 du résidu **a** donne un pic de corrélation avec son propre C-2, et pas avec ses propres C-3 et C-5. Ceci confirme également l'anomérie α de ce résidu, lui aussi sous forme glucopyranoside. Les autres pics de corrélation obtenus pour les résidus **b-q** sont des contacts H-1/H-2', démontrant que tous ces résidus sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,2 (figure 49). Pour le résidu **a**, son H-1 corrèle avec le **iH-6**, ce qui montre que le résidu **a** est lié au résidu **i** par l'intermédiaire d'une liaison α -1,6. La combinaison des analyses par HSQC-TOCSY et HSQC-NOESY permet donc d'établir la séquence primaire complète du glucane synthétisé *par R. sphaeroides* (figure 50).

Ce glucane est similaire à ceux précédemment décrits *pour B. solanacearum* et *X. campestris*. Toutefois, cette molécule est fortement substituée par 1 à 7 résidus de succinate, et

elle possède 18 résidus de glucose par molécule, ce qui est un degré de polymérisation déjà observé pour les glucanes cycliques liés en β -1,2.

Ce glucane synthétisé par *R. sphaeroides* a été enrichi en ^{13}C , ceci afin de permettre une étude conformationnelle de cette molécule en solution. La modélisation moléculaire de ce glucane devra être comparée à celle du glucane de *B. solanacearum*, ceci afin d'étudier l'influence de la taille du cycle sur la structure tridimensionnelle de ces molécules.

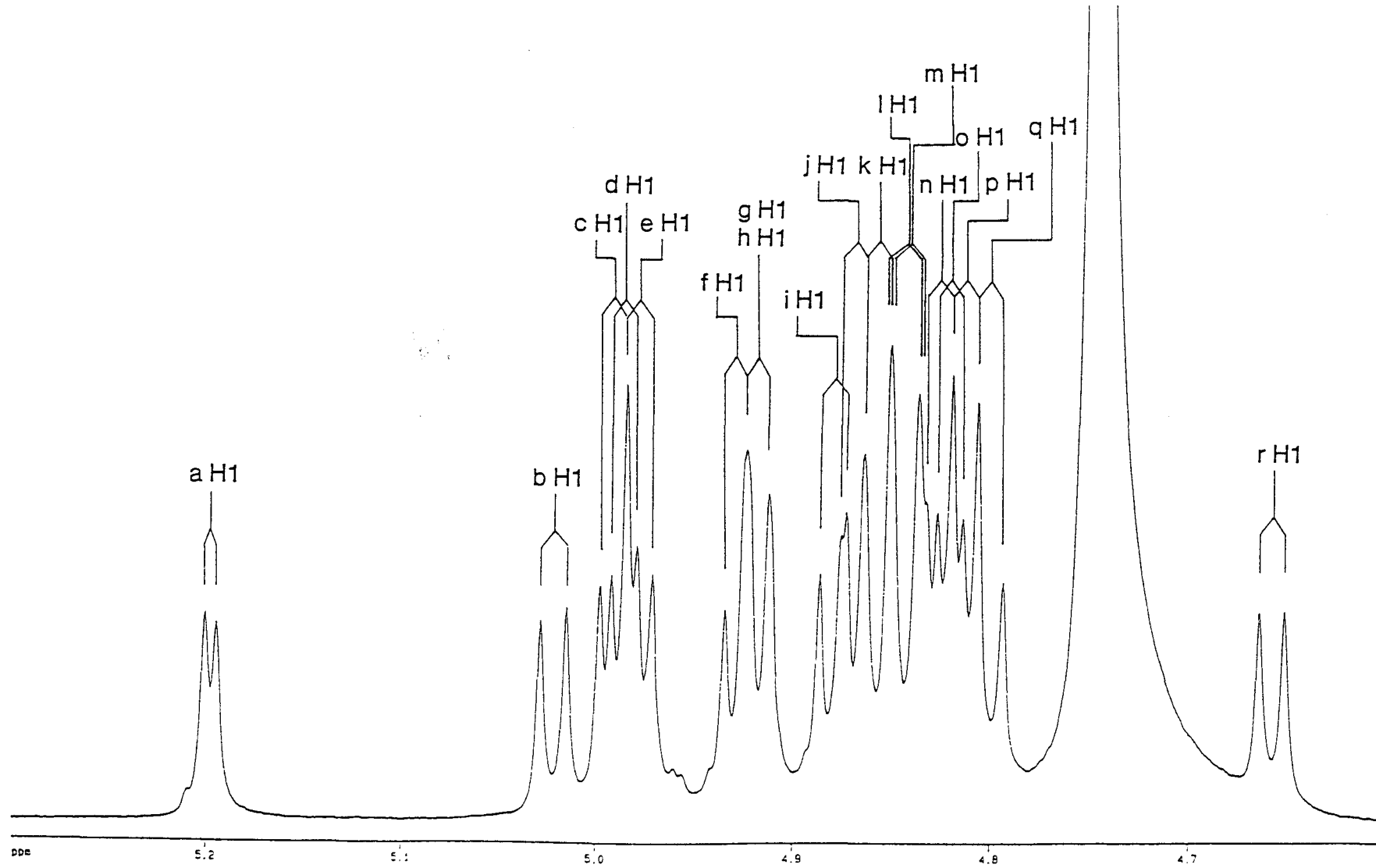


Figure 43 : région du spectre RMN ^1H à 600 MHz montrant les protons anomériques du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

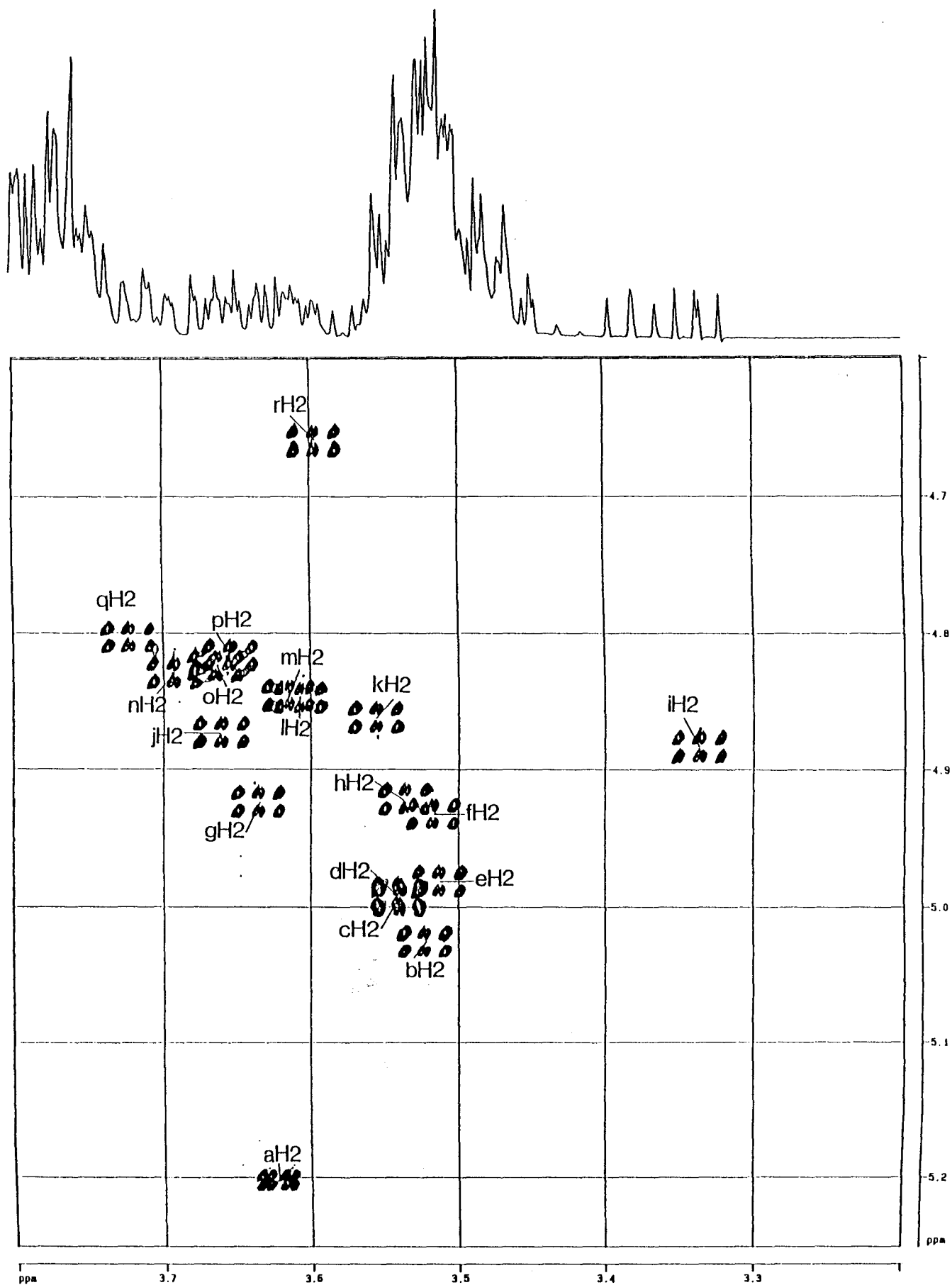


Figure 44 : spectre COSY du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

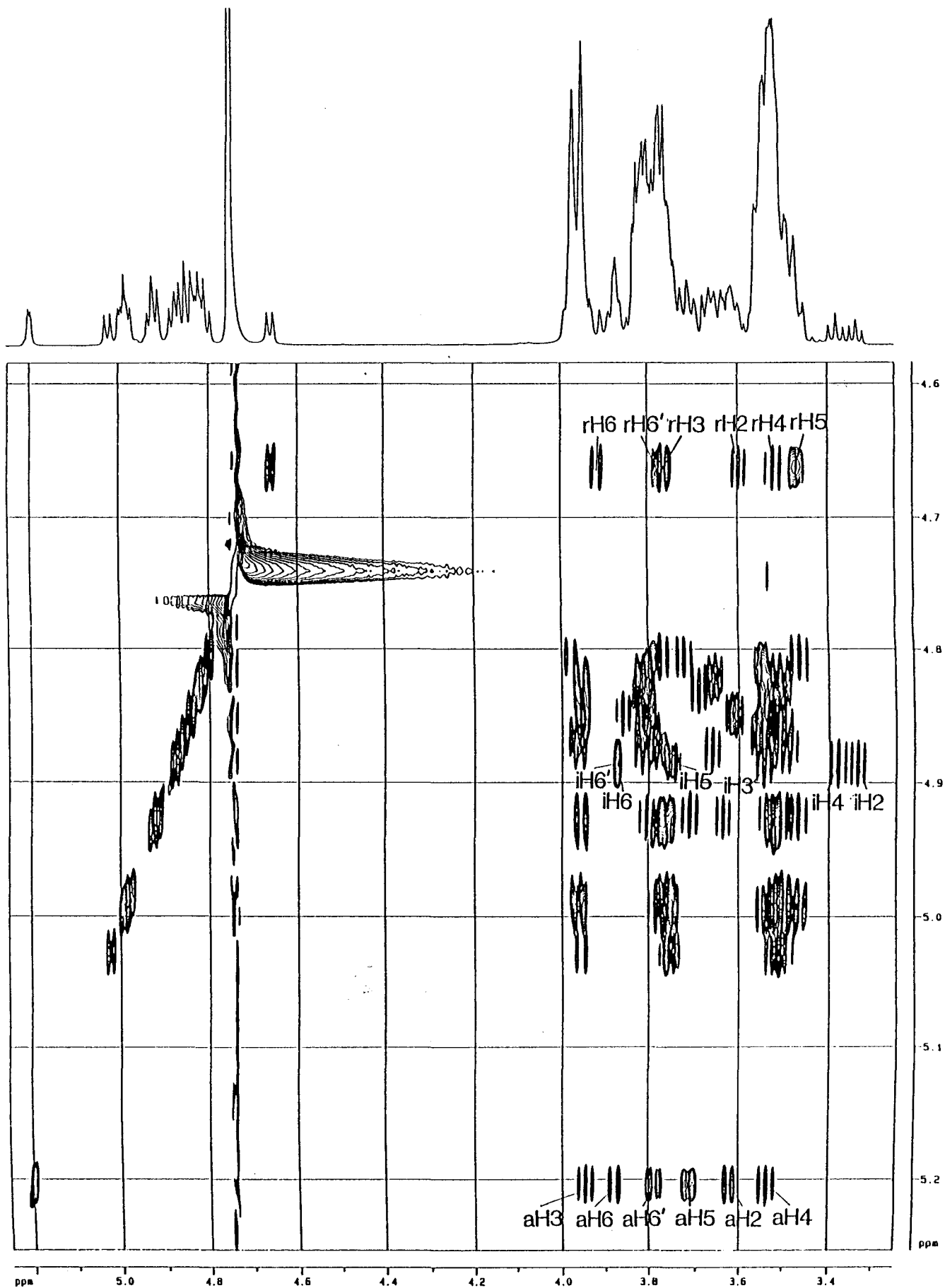


Figure 45 : spectre TOCSY du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

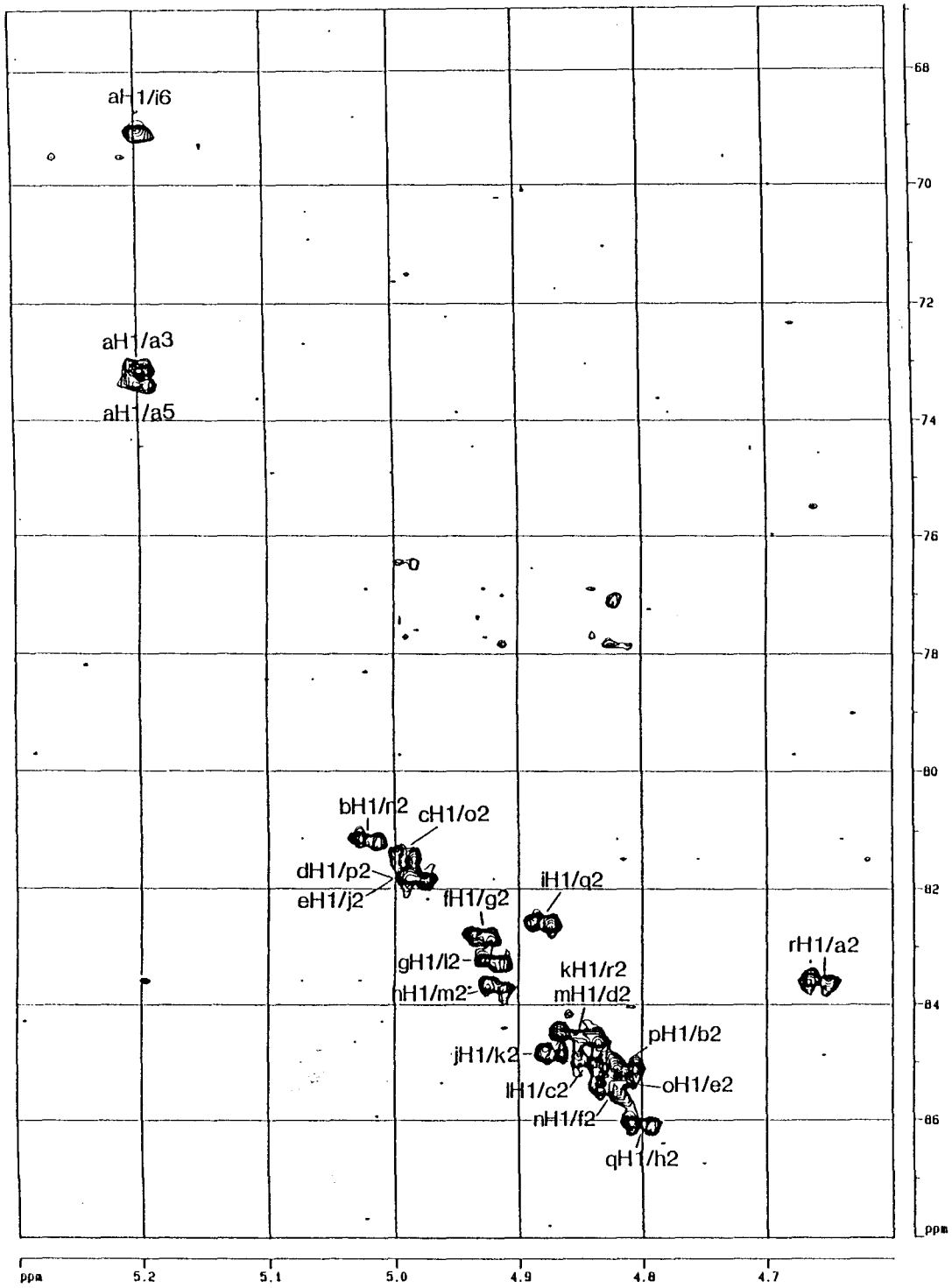


Figure 47 : spectre HMBC du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

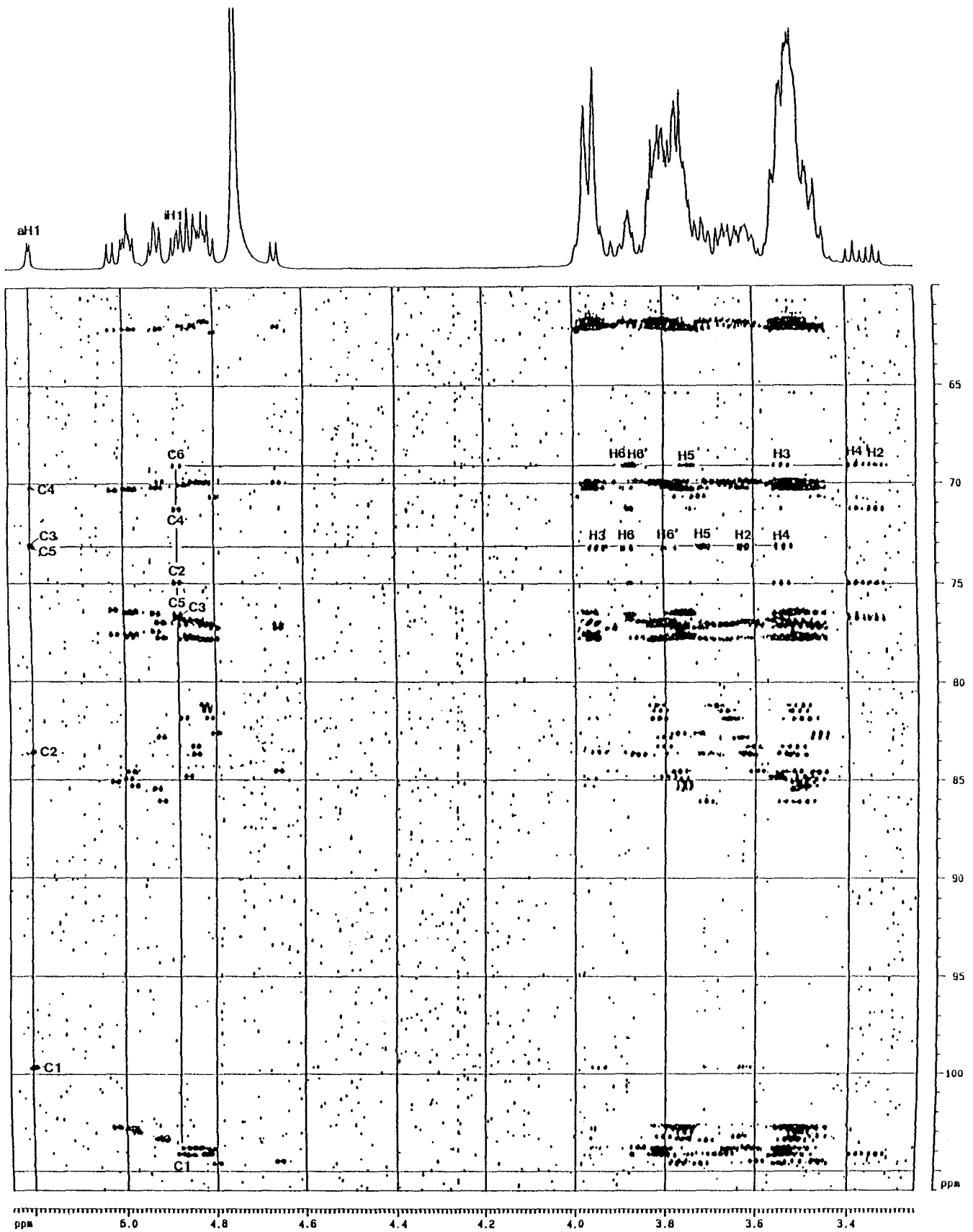


Figure 48 :spectre HSQC-TOCSY du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

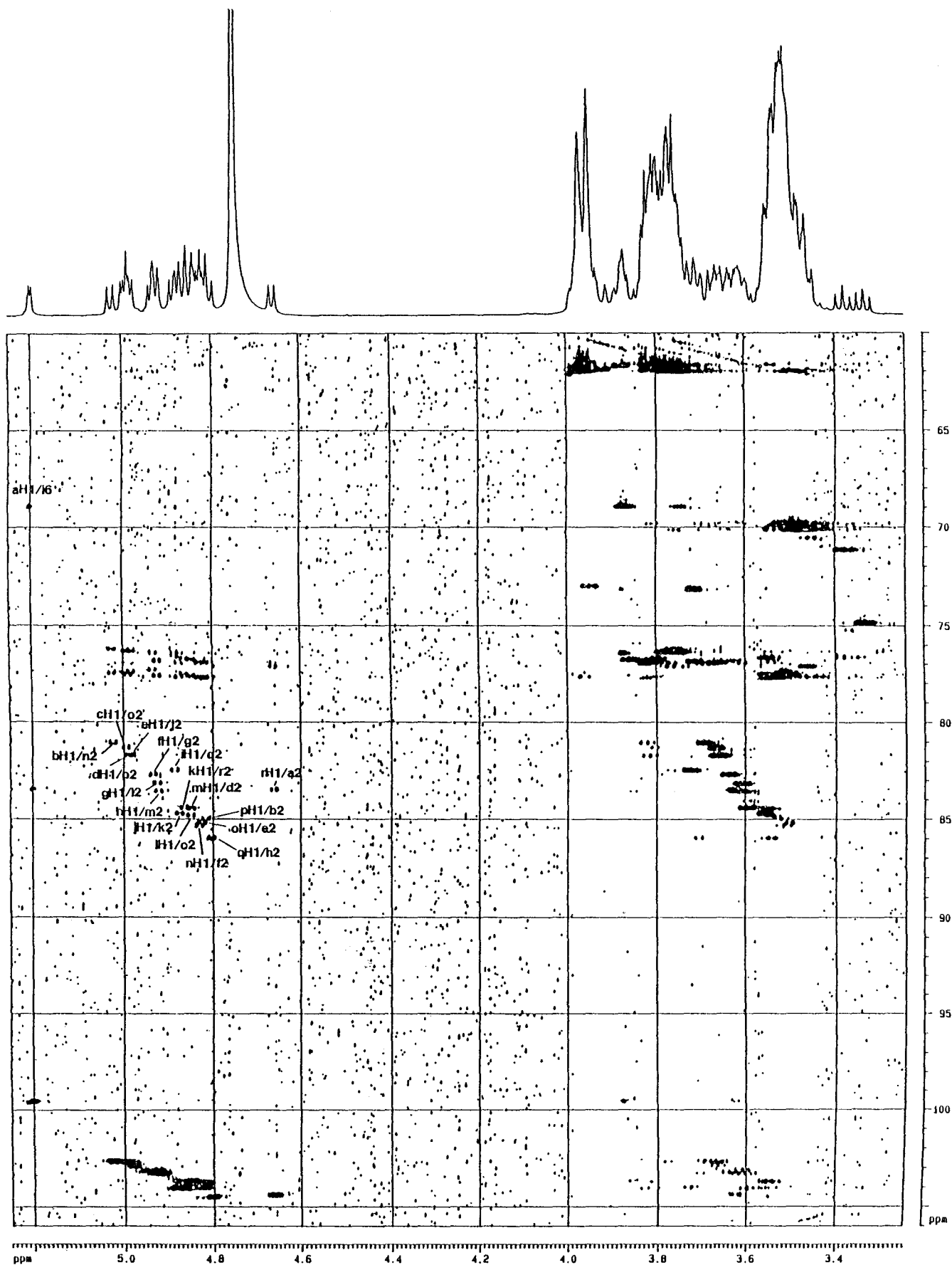


Figure 49 : spectre HSQC-NOESY du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

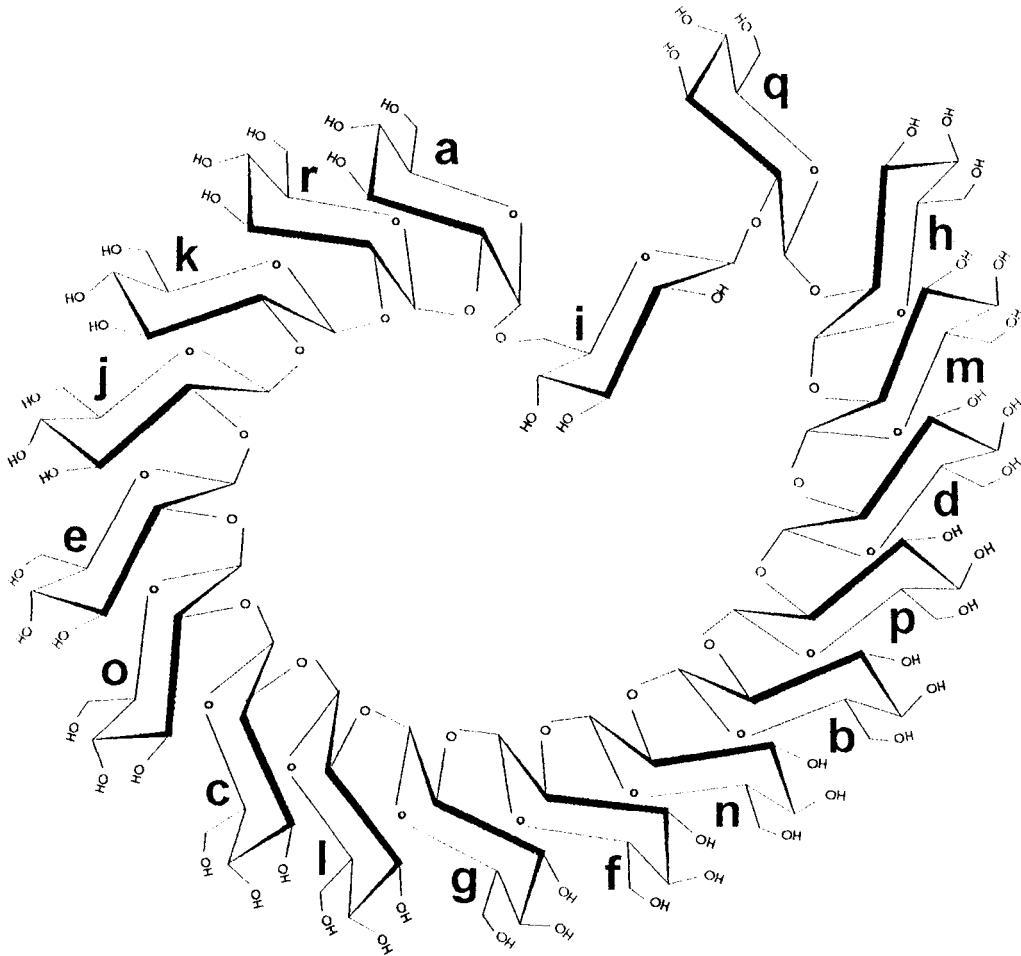


Figure 50 : séquence primaire du glucane désubstitué synthétisé par *R. sphaeroides*.

résidus	protons						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
a	5.197	3.621	3.947	3.534	3.711	3.880	3.786
b	5.021	3.521	3.759	3.492	3.517	3.958	N.D.
c	4.992	3.538	3.767	3.464	3.513	3.962	N.D.
d	4.986	3.539	3.782	3.461	3.509	3.960	N.D.
e	4.977	3.510	3.758	3.481	3.512	3.968	N.D.
f	4.927	3.515	3.761	3.503	3.517	3.955	N.D.
g	4.920	3.634	3.805	3.465	3.506	3.967	N.D.
h	4.916	3.539	3.709	3.486	3.506	3.958	N.D.
i	4.880	3.333	3.540	3.379	3.749	3.871	3.871
j	4.878	3.660	3.814	3.483	3.531	3.959	N.D.
k	4.858	3.554	3.794	3.496	3.529	3.971	N.D.
l	4.844	3.605	3.804	3.519	3.539	3.955	N.D.
m	4.842	3.613	3.859	3.508	3.539	3.950	N.D.
n	4.826	3.691	3.819	3.498	3.536	3.958	N.D.
o	4.820	3.663	3.811	3.505	3.522	3.954	N.D.
p	4.813	3.653	3.813	3.503	3.545	3.957	N.D.
q	4.799	3.721	3.774	3.460	3.543	3.980	N.D.
r	4.657	3.595	3.763	3.516	3.463	3.919	3.780

Tableau 13 : déplacements chimiques des protons du glucane associé à *R. sphaeroides*.
N. D. : non déterminé.

Résidus	Carbones					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
a	99.53	83.55	73.02	70.21	73.16	61.70
b	102.67	85.06	76.24	70.27	77.55	62.12
c	102.67	84.90	76.41	70.22	77.55	62.07
d	102.68	84.92	76.41	70.21	77.70	62.11
e	102.49	85.29	76.33	70.20	77.54	62.08
f	103.21	85.41	76.44	70.15	77.37	62.10
g	103.14	82.75	76.92	70.17	77.73	62.04
h	102.24	86.05	76.92	69.85	77.73	62.05
i	103.97	74.92	76.63	69.04	76.48	69.04
j	103.63	81.78	76.99	70.06	77.79	61.95
k	103.97	84.77	76.74	69.96	77.61	62.01
l	103.62	83.22	76.83	69.94	77.72	61.87
m	103.62	83.63	76.83	69.83	77.72	61.98
n	103.94	81.11	77.02	69.89	77.79	61.71
o	103.95	81.37	77.03	69.86	77.82	61.62
p	103.64	81.76	76.95	69.91	77.80	61.73
q	104.43	82.53	77.18	70.59	77.76	62.25
r	104.33	84.48	77.16	77.14	76.98	61.96

Tableau 14 : déplacement chimique des carbones du glucane associé de *R. sphaeroides*.

CONCLUSIONS

I) La détermination d'une nouvelle famille d'OPG

Avant la réalisation de ce travail, on connaissait trois grandes familles d'OPG qui possèdent le squelette glucosidique suivant :

(i) Les OPG linéaires branchés s'organisant autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2, avec des branches liées en β -1,6 et constituées d'un seul résidu de glucose. C'est le cas d'*E. coli*.

(ii) Les OPG cycliques liés en β -1,2. C'est le cas de *R. meliloti* et *A. tumefaciens*.

(iii) Les OPG cycliques liés en β -1,3 ; β -1,6. C'est le cas de *B. japonicum*.

P. syringae et *E. chrysanthemi* synthétisent des OPG faisant partie de la première famille et les OPG d'*A. brasilense* font partie de la troisième famille. De plus, la structure proposée par Rolin et coll. (1992) des OPG synthétisés par *B. japonicum* semble ne pas être correcte, vu la grande similitude des spectres RMN obtenus entre les OPG synthétisés par *B. japonicum* et *A. brasilense*.

B. solanacearum, *X. campestris* et *R. sphaeroides* synthétisent des OPG faisant partie d'une quatrième famille. Ceux-ci sont cycliques, homogènes en taille et liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,2 et d'une unique liaison α -1,6.

L'étude de la structure des OPG appartenant à des genres bactériens différents, peut nous aider à cerner les mécanismes évolutifs touchant les gènes gouvernant la biosynthèse des OPG. En effet, si l'on reporte la structure des OPG sur l'arbre phylogénétique des bactéries à Gram négatif (figure 51), on constate que la nouvelle famille d'OPG décrite dans ce travail est présente chez des bactéries classées aujourd'hui dans trois des cinq subdivisions des protéobactéries (gamma pour *X. campestris*, bêta pour *B. solanacearum* et alpha pour *R. sphaeroides*). Il semble donc que la diversité structurale de ces molécules ne recouvre pas exactement les divisions phylogénétiques établies sur la base de la comparaison des séquences primaires des ARN ribosomiques. Toutefois, *E. coli*, *P. syringae* et *E. chrysanthemi*, qui sont trois bactéries faisant partie de la subdivision gamma synthétisent des OPG de la première famille d'OPG. De même, *R. meliloti*, *A. tumefaciens* et *Brucella* (trois bactéries faisant partie de la subdivision alpha) synthétisent des OPG faisant partie de la troisième famille. Si on privilégie une évolution à partir de gènes ancestraux communs, il faut en conclure que la classification actuelle n'est pas valide. L'alternative serait que les gènes de synthèse de la quatrième famille des OPG aient été transmis horizontalement.

Proteobacteria

		Résidus Glc	Liaisons	Substituants
Alpha subdivision	<i>Azospirillum brasilense</i>	12-13	β , 1-3 β , 1-6	Succinate
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	10-13	β , 1-3 β , 1-6	P-Choline
	<i>Rhizobium meliloti</i>	17-24	β , 1-2	P-Glycerol Succinate
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
	<i>Brucella abortus</i>	17-24	β , 1-2	None
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	18	β , 1-2 α , 1-6	Succinate
Beta subdivision	<i>Burkholderia solanacearum</i>	13	β , 1-2 α , 1-6	None
	<i>Xanthomonas campestris</i>	16	β , 1-2 α , 1-6	None
Gamma subdivision	<i>Pseudomonas syringae</i>	6-13	β , 1-2 β , 1-6	None
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	5-12	β , 1-2 β , 1-6	Succinate
	<i>Escherichia coli</i>	5-12	β , 1-2 β , 1-6	P-Glycerol P-Ethanolamine Succinate

Figure 51 : présentation de la biodiversité de la structure des OPG en fonction de la position des bactéries qui les synthétisent sur l'arbre phylogénétique.

II) Des gènes conservés, donc des protéines similaires synthétisent des OPG similaires

La comparaison avec les séquences contenues dans les banques de données des séquences protéiques des produits du locus *mdoGH* a révélé l'existence d'une très forte homologie (égale à 80 %) avec les produits d'un locus de pathogénéicité de *P. syringae* pv. *syringae* : le locus *hrpM*. Ces deux locus sont tous deux organisés en un opéron de deux gènes, dont les séquences nucléotidiques sont identiques à 66 %.

Cette identité de structure s'accompagne d'une identité de fonction. En effet, le gène *hrpM* de *P. syringae* pv. *syringae* a été exprimé chez *E. coli*. La présence de ce gène permet de compléter une mutation *mdoH*, et donc de restaurer la synthèse des OPG.

Les OPG synthétisés par *E. coli* grâce à sa propre glucosyl-transférase (MdoH) ou grâce à celle de *P. syringae* (HrpM) possèdent une structure identique.

De plus, l'expression de *mdoGH* dans une souche *hrpM* restaure la synthèse des OPG. L'équipe de D. Mills a récemment montré que cette restauration de synthèse des OPG s'accompagne d'une restauration des symptômes de virulence. Ces expériences prouvent l'homologie fonctionnelle entre le gène de virulence *hrpM* et l'opéron *mdoGH*.

Les OPG de *P. syringae* jouent donc un rôle dans les processus d'infection de la plante et ces molécules possèdent un squelette glucosidique très semblables à celui d'*E. coli*, mais ils sont non substitués.

Les protéines HrpM et MdoH ont donc des activités catalytiques similaires, conduisant à la synthèse d'OPG possédant globalement la même structure (linéaires, de 5 à 13 résidus de glucose s'organisant autour d'une chaîne de résidus de glucose liés en β -1,2, avec les branches constituées d'un seul résidu de glucose lié en β -1,6).

E. chrysanthemi synthétise des OPG possédant un squelette glucosidique similaire à ceux d'*E. coli* et de *P. syringae*. On pouvait donc penser que cette bactérie possède un glucosyl-transférase très proche de celle d'*E. coli*. Ceci a été révélé récemment au laboratoire, en collaboration avec Nicole Cotte-Pattat et Janine Robert-Baudoy de l'I.N.S.A. de Lyon. En effet, Frédéric Page et Silvia Altabe, au laboratoire, ont cloné et séquencé le locus *opgAB* responsable de la synthèse des OPG d'*E. chrysanthemi*. Ce locus possède la même organisation en opéron

constitué de deux gènes que *mdoGH* et *hrpM*, et ces produits présentent une très forte homologie avec les produits de ces deux gènes.

Les bactéries synthétisant des OPG ayant une structure commune du squelette glucidique possèdent donc des gènes responsables de leur synthèse fortement homologues. Ce résultat avait déjà été montré avec les gènes *ndvA/chvA* et *ndvB/chvB* de *R. meliloti* et d'*A. tumefaciens*, responsables de la synthèse des glucanes cycliques liés en β -1,2.

La structure du squelette glucosidique des OPG semble donc dépendre de propriétés intrinsèques des glucosyl-transférases. Toutefois, il existe un certain degré de variation. Par exemple, *P. syringae* synthétise des OPG possédant une variation en tailles plus grande, ainsi qu'un nombre de résidus de glucose plus important. Mais la différence majeure est la présence ou l'absence de substituants. Les substituants semblent résulter de la présence d'activités supplémentaires et non essentielles. Par exemple, une souche d'*E. coli mdoB*, incapable de transférer le *sn*-1-phosphoglycérol, synthétise un squelette glucosidique identique à celui d'une souche de type sauvage. L'activité de la phosphoglycérol-transférase I (MdoB) est absente chez *P. syringae* et *E. chrysanthemi*. Ce gène *mdoB* permettant la substitution du squelette glucosidique est-il présent et non exprimé ou a-t-il été perdu chez ces bactéries, ou acquis par *E. coli* au cours de l'évolution ?

R. meliloti et *A. tumefaciens* synthétisent des OPG substitués par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol. Le clonage, ainsi que le séquençage de la phosphoglycérol-transférase est en cours (Breedveld et coll., 1995b). Il sera alors intéressant de voir si les phosphoglycérol-transférases d'*E. coli*, *R. meliloti* et *A. tumefaciens* sont conservées, alors qu'il n'existe aucune conservation des glucosyl-transférases.

Le squelette glucosidique des OPG synthétisés par *B. solanacearum*, *X. campestris* et *R. sphaeroides* diffèrent par leurs tailles respectives (13, 16, et 18 résidus de glucose par molécule, respectivement), mais ils possèdent les mêmes propriétés structurales. Si les structures des squelettes glucosidiques des OPG résultent de propriétés intrinsèques des glucosyl-transférases, on peut dire que ces trois bactéries possèdent des glucosyl-transférases homologues. Il sera intéressant de vérifier cette hypothèse chez des bactéries phylogénétiquement si éloignées.

III) Les relations structures-fonctions des OPG

Plus le nombre d'OPG étudiés augmente, plus les caractéristiques structurales de ces composés semblent se diversifier. Cette hétérogénéité de structure et de substitution est-elle compatible avec une fonction commune ?

Si une fonction commune existe pour tous les OPG, il semble peu probable que les substitutions jouent un rôle. En effet, les OPG de *P. syringae*, *B. solanacearum* et *X. campestris* sont totalement dépourvus de substitution, ceux d'*A. brasilense* et de *R. sphaeroides* sont substitués à des taux variables par des résidus de succinate. Le fait que les OPG d'*E. coli*, d'*A. tumefaciens* et de *R. meliloti* soient fortement substitués par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol et de succinate, apportant une charge globale négative à ces molécules, avait conduit Kennedy (1987), ainsi que Breedveld et Miller (1994) à émettre l'hypothèse que les OPG qui s'accumulent dans le périplasme des bactéries cultivées à basse osmolarité doivent participer à la création du potentiel de Donnan à travers la membrane externe et faire diminuer la pression de turgescence qui devrait s'exercer sur la membrane interne. Du fait que plusieurs OPG décrits dans ce travail sont dépourvus de tous substituants, il est peu probable que la fonction commune des OPG soit le maintien de ce potentiel de Donnan dans la cellule.

Aucune fonction véritable n'a encore été associée aux OPG. Toutefois, l'incapacité du mutant *hrpM* de *P. syringae* à induire la pathogénéicité sur une plante hôte ou la réaction d'hypersensibilité sur une plante non-hôte, est liée à l'absence de celui-ci. Ce résultat va donc dans le même sens que ceux qui montrent que des *Rhizobiaceae* dépourvues de leur OPG sont incapables de coloniser leurs hôtes respectifs. Toutefois, la différence majeure est que les OPG de *P. syringae* sont linéaires, alors que ceux des *Rhizobiaceae* sont cycliques. Le caractère cyclique des OPG ne semble donc pas être un facteur essentiel dans l'établissement de leurs rôles dans les relations bactérie-hôte.

L'ajout de glucanes exogènes au moment de l'infection à des souches mutantes *ndvB* de *R. meliloti* ne restaure pas l'invasion. Les OPG ne peuvent donc pas être comparés aux facteurs de nodulation produits par les *Rhizobiaceae*, signaux qui induisent l'organogenèse des nodules chez la plante, et qui spécifient le spectre d'hôte.

Les mutants *ndvA* et *chvA* de *R. meliloti* et d'*A. tumefaciens*, respectivement, synthétisent des OPG dont le squelette glucidique n'est pas modifié comparé à ceux des souches sauvages. Toutefois, ils restent dans le cytoplasme et sont donc non substitués, le périplasme étant le lieu

des différents mécanismes de substitution (Breedveld et coll., 1995b). Ces mutants induisent la formation de nodules inefficaces dans la fixation de l'azote, car vides de bactéroïdes. Etant donné que les substitutions ne semblent pas jouer un rôle dans les processus d'infection de la plante, on peut dire que les OPG sont utiles dans le périplasma de la bactérie, dans une certaine quantité au moment de la mise en place de l'interaction.

La présence de la liaison α -1,6 chez les OPG faisant partie de la nouvelle famille induit de telles contraintes au sein du cycle que tous les protons anomériques des différents résidus de glucose peuvent être discriminés, contrairement aux glucanes cycliques liés en β -1,2. Un modèle de structure tridimensionnelle de ces composés nous sera très utile. En effet, ces molécules cycliques peuvent présenter une cavité susceptible de recevoir une molécule « invitée ». A l'instar des cyclodextrines, ces possibilités d'inclusion permettraient d'ouvrir des domaines d'application pharmaceutiques et alimentaires. De plus, ce phénomène pourrait être utile à la recherche de mutants et la caractérisation des gènes impliqués.

Des travaux préliminaires sur les glucanes cycliques liés en β -1,2 ont montré, par des techniques de mesures d'absorption UV-Visible et de dichroïsme circulaire, une certaine solubilisation dans l'eau de certains composés relativement hydrophobes tels que l'amphotéricine B (un antibiotique) (Morris, 1991), ou la naringérine (Morris, 1992) qui est une molécule rencontrée dans les exsudats racinaires. Des travaux plus récents montrent que ces glucanes s'enroulent globalement sur eux-mêmes, ce qui diminue considérablement la taille de la cavité hydrophobe susceptible d'accueillir une molécule hôte. Toutefois, ces molécules passent par un équilibre entre plusieurs conformations, ce qui réduit considérablement les possibilités de complexation. Nous espérons que les glucanes cycliques faisant partie de la nouvelle famille d'OPG présenteront une forme plus régulière et donc une cavité plus large.

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique n°1

1) Souches et milieux

Les souches utilisées sont décrites dans le tableau 15. Les souches d'*E. coli*, *R. sphaeroides*, *A. brasilense* et *E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C avec une forte agitation. Les souches de *B. solanacearum*, *P. syringae* pv. *syringae* et *X. campestris* ont été cultivées à 24°C avec une agitation modérée. Toutes ces bactéries ont été cultivées dans un milieu de faible osmolarité (LOS) qui contient : K₂HPO₄ (1mM), (NH₄)₂SO₄ (1,5 mM), MgCl₂ (0,08 mM), FeSO₄ (0,5 mM), thiamine (2 mg/l) et un hydrolysât de caséine (4 g/l ; casaminoacids, vitamin-free, laboratoire Difco). Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris. L'osmolarité de ce milieu a été estimée à 70 mosM. Elle peut être augmentée par l'addition de NaCl.

Si besoin, l'antibiotique a été rajouté à la concentration suivante : kanamycine, 50 µg/ml.

La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Les différentes souches sont conservées dans du glycérol 15 % à -20°C.

2) Détermination du rapport glucose/glycérol des OPG

Les souches d'*E. coli* NFB1018 et NFB1019 sont cultivées une nuit à 30°C dans un milieu LOS additionné de 2-³H glycérol (0,45 mM ; 296 Mbq/mmmole) et de kanamycine. On effectue le dosage sur des cultures de 20 ml arrêtées en phase stationnaire de croissance. La méthode d'extraction fait intervenir l'acide tricholoacétique 5 % dans lequel les oligosaccharides restent solubles tandis que les macromolécules précipitent (de l'albumine de sérum bovin à 0,8 % est ajoutée pour servir d'entraîneur). Après centrifugation, on ajoute au surnageant du charbon de bois (15 mg/ml) sur lequel les oligosaccharides s'adsorbent. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée destinés à éliminer la radioactivité non spécifique, on ajoute de la pyridine 15 % pour extraire les molécules adsorbées sur le charbon. L'extrait pyridine est déposé sur une colonne de Sephadex G25. Les fractions contenant le matériel radioactif sont collectées et lyophilisées. On détermine le taux de glycérol d'après le calcul de la radioactivité spécifique et on effectue un dosage des sucres selon la méthode au phénol sulfurique (Dubois et coll., 1956).

Souches	Génotypes
<i>E. coli</i> JM101	$\Delta(lac-pro)$, <i>thi</i> , <i>supE</i> , <i>endA</i> / F', <i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> _q , <i>lacZM15</i>
<i>E. coli</i> NFB226	$\Delta(lac-pro)$, <i>thi</i> , <i>mdoH200::Tn10</i> , <i>supE</i> , <i>endA</i> / F', <i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> _q , <i>lacZM15</i>
<i>E. coli</i> NFB228	<i>pyrC46</i> , <i>glpD3</i> , <i>glpK4</i> , <i>glpR2</i> , <i>plsB26</i> , <i>phoAB</i> , <i>mdoH200::Tn10</i> , <i>fhuA22</i> , <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> NFB965	pNF309(<i>mdoH</i> ⁺)/NFB226
<i>E. coli</i> NFB1006	pNF331(<i>hrpM</i> ⁺)/NFB226
<i>E. coli</i> NFB1018	pNF309(<i>mdoH</i> ⁺)/NFB228
<i>E. coli</i> NFB1019	pNF331(<i>hrpM</i> ⁺)/NFB228
<i>E. coli</i> NFB748	<i>mdoB::Tn10</i>
<i>P. syringae</i> R32	
<i>P. syringae</i> ps9021	<i>hrpM::Tn5</i>
<i>P. syringae</i> E3	pOSU239(<i>mdoGH</i> ⁺)/ps9021
<i>E. chrysanthemi</i> 3937	
<i>B. solanacearum</i> T11	
<i>X. campestris</i> N1	
<i>R. sphaeroides</i> H	
<i>A. brasilense</i> ATCC 29710	

Tableau 15 : liste des souches utilisées.

Fiche technique n°2

1) Extraction des OPG

a) Méthode d'extraction à l'éthanol

La culture est arrêtée en phase stationnaire de croissance par l'addition d'un volume d'éthanol absolu. Le mélange est alors soumis à une très forte agitation. Après centrifugation à 9000 g à 4°C pendant 15 mn destinée à éliminer les débris cellulaires, le surnageant est concentré jusqu'à un volume minimal à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ce concentré est ensuite délipidé et déproteinisé à l'aide d'un traitement par le mélange chloroforme/méthanol 2:1 (v/v). La phase aqueuse et méthanolique est concentrée jusqu'à un volume minimal à l'aide d'un évaporateur rotatif.

b) Méthode d'extraction à l'acide trichloroacétique

La culture est arrêtée en phase stationnaire par centrifugation à 5000 g à 4°C pendant 15 mn. Le surnageant de culture n'est pas conservée et les cellules sont reprises dans un volume minimum d'eau milli-Q. Les cellules sont alors traitées par l'acide trichloroacétique à 5 %. L'extrait est alors soumis à une forte agitation. Après centrifugation à 9000 g pendant 15 mn, le surnageant est neutralisé par l'ajout de NH_4OH 10 % et concentré jusqu'à un volume minimal à l'aide d'un évaporateur rotatif. Si besoin est (par exemple si la quantité de cellules traitées est importante), le concentré peut être soumis à un traitement par le chloroforme/méthanol 2:1 (v/v).

2) Purification des OPG

a) Dessalage sur Sephadex G15

Les fractions concentrées sont dessalées par passage sur une colonne de Sephadex G15. L'élution est effectuée à l'aide d'eau milli-Q. Une aliquote de chaque fraction est analysée par la méthode au phénol sulfurique de Dubois et coll. (1956). Les fractions contenant le matériel glucidique sont recueillies et lyophilisées.

b) Chromatographie de gel filtration

Le matériel glucidique est repris dans un volume minimum du tampon d'élution 0,5 % acide acétique, et déposé sur une colonne de Biogel-P4 ou Biogel-P6. La détection s'effectue par

la méthode au phénol sulfurique (Dubois et coll., 1956). Les fractions renfermant les oligosaccharides sont recueillies et lyophilisées. Si besoin est, les oligosaccharides obtenus peuvent être dessalés sur une colonne de Biogel-P2 ou sur une colonne de fractogel TSK HW 40 avec un repérage par réfractométrie.

Fiche technique n°3

1) Détermination du rapport molaire en monosaccharides des OPG

Les monosaccharides composant le polymère sont libérés par méthanolyse (mélange MetOH/HCl 0,5 N, 80°C pendant 24 h). Après évaporation du réactif, les méthylglycosides sont O-triméthylsilylés par 100 µl du mélange pyridine/BSTFA (v/v) à température ambiante pendant 2 heures. Les méthylglycosides triméthylsilylés sont identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire de silicone OV101 (25 m x 0,32 mm DI), pression d'entrée du gaz vecteur (hélium) 0,4 bar à la température programmée de 120°C à 240°C à raison de 2°C/mn.

Préalablement à la méthanolyse, les oligosaccharides peuvent être réduits, ceci afin de déterminer le rapport glucose/glucitol. Dans ce but, les oligosaccharides sont repris par 1 ml d'eau ajusté à pH 10 par de l'ammoniaque 10 %. Ils sont ensuite réduits par addition de 2 mg de BH₄K (une nuit à température ambiante). La réduction est arrêtée par addition d'acide acétique 0,05 N jusqu'à pH 5-6. Après évaporation, les borates sont éliminés sous forme de méthylborates à l'aide de 3 codistillations par le méthanol.

2) Analyse des liaisons glycosidiques des OPG par méthylation

Les oligosaccharides (approximativement 500 µg) sont méthylés par la méthode de Pazparente et coll. (1984) au lithium méthylsulfinyl carbanion et iodure de méthyle :

Les oligosaccharides sont solubilisés dans 200 µl de DMSO anhydre dans un bain ultrasonique pendant une heure. Après solubilisation, on additionne 200 µl de base de méthylation (lithium méthyl sulfinyl carbanion) après saturation à l'argon, le mélange est remis au bain ultrasonique pendant une heure. Après congélation, 400 µl d'iodure de méthyle sont additionnés et l'alkylation se déroule pendant une heure au bain ultrasonique. La méthylation est arrêtée par addition d'eau. Quelques cristaux de thiosulfate de sodium sont ajoutés pour décolorer la solution. On extrait le produit méthylé à trois reprises avec du chloroforme (3x500 µl). L'ensemble des phases chloroformiques est lavé 15 fois à l'eau puis évaporé sous courant d'azote et lyophilisé. Le lyophilisât est repris par 500 µl de chloroforme et réparti dans deux tubes.

Le contenu de l'un des tubes est soumis à une hydrolyse trifluoroacétique (ATFA 4 N, 100°C pendant 4 heures). Les éthers méthyliques ainsi libérés sont ensuite analysés sous forme de polyols partiellement méthylés et acétylés obtenus après réduction par le borodéutérure de sodium et peracétylation (pyridine-anhydride acétique 250 µl 1:4 v/v une nuit à température ambiante). Le

contenu du second tube est méthanolysé (80°C, 24 h, MeOH/HCl 0,5 N), puis séché sous courant d'azote. On procède ensuite à une peracétylation. Le réactif d'acétylation est évaporé et les éthers méthyliques obtenus sont identifiés sous la forme de leurs méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés.

Les éthers méthyliques libérés sont analysés dans les deux cas par couplage chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire de Silicone OV101 30 m x 0,321 mm DI, pression d'entrée du gaz vecteur 0,4 bar, température programmée de 110°C-240°C à raison de 3°C/mn) - spectrométrie de masse (GC-MS) selon la méthode de Fournet et coll. (1981).

Si on veut méthyler les oligosaccharides fortement anioniques tels que le MDO, il faut modifier la procédure de la façon suivante : préalablement à la méthylation et pour assurer une parfaite solubilisation dans le solvant de méthylation (DMSO) il est nécessaire de « masquer » les charges que portent les oligosaccharides. En effet, les sucres porteurs de résidus acides sont très difficiles à méthyler du fait de leur insolubilité quasi totale dans le DMSO. Les oligosaccharides sont injectés sur une pipette pasteur remplie de résine Dowex 50x2 (forme triéthylammonium). Après élution à l'eau milliQ, la fraction obtenue est directement lyophilisée et les oligosaccharides chargés possédant comme contre-ion le triéthylammonium sont aptes à la méthylation.

Fiche technique n°4

1) Analyse des OPG par acétolyse

L'acétolyse est une technique de clivage des liaisons glycosidiques qui va agir préférentiellement sur les liaisons 1,6 (Rosenfeld et Ballou, 1974). L'acétolyse a été affectée selon la méthode de Dubourdiou et coll. (1981). Les OPG sont dissous dans un 1 ml du réactif acétolysant (acide acétique : anhydride acétique : acide sulfurique ; 10 : 10 : 1). La réaction s'opère pendant 24 heures à température ambiante. L'acétolysat est déposé sur 2 g de glace et neutralisé au bicarbonate de sodium. On extrait les oligosaccharides peracétylés à trois reprises avec du chloroforme (3x1 ml). Les phases chloroformiques sont réunies et lavées par une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis séchées par du sulfate de sodium anhydre.

Après évaporation sous azote, les produits sont repris dans 500 µl d'acétone et 2 ml de soude 0,2 M. Après 30 minutes à 4°C, la réaction est stoppée par l'ajout de Dowex 50x8 (forme H⁺). Les produits déacétylés sont ensuite dessalés sur Biogel-P2. Une aliquote de chaque fraction est analysée par la méthode au phénol sulfurique de Dubois et coll. (1956).

2) Traitement des OPG par l'acide fluorhydrique aqueux

Afin de cliver les liaisons phosphodiester, les échantillons sont traités par 100 µl d'acide fluorhydrique aqueux à 48 % pendant 60 h à 6°C. Après ajout de 700 µl de LiOH froid saturé, l'acide fluorhydrique est éliminé sous forme de LiF insoluble qui se forme après l'ajout de 700 µl de LiOH saturé froid.

Le surnageant est chromatographié sur une pipette pasteur rempli de résine Dowex 50x8 (forme H⁺), puis sur une colonne de pipette pasteur rempli de DEAE-Trisacryl (forme Cl⁻). Les oligosaccharides, alors dépourvus de substituants, sont ensuite dessalés sur une colonne de Biogel-P2.

Fiche technique n°5

1) Chromatographie haute performance d'échange d'anions des OPG

Les chromatographies analytiques ou préparatives ont été réalisées sur un système Dionex Bio-LC équipé d'une colonne CarboPac PA100 (4 x 250 mm) ou d'une colonne CarboPac PA1 (10 x 250 mm) et d'un détecteur à champs ampérométrique pulsé (PAD II).

a) Chromatographie à haut pH

Deux de gradients ont été mis au point, qui correspondent à la séparation des OPG fortement chargés et des OPG neutres.

α) Gradient pour les OPG fortement chargés :

La séparation est effectuée en utilisant une solution de soude 150mM comme éluant 1 et une solution de soude 150 mM contenant 1 M d'acétate de sodium comme éluant 2. Le gradient utilisé consiste en (a) 150 mM de NaOAc dans la soude 150 mM pendant 5 mn et (b) un gradient linéaire variant de 150 à 400 mM de NaOAc en 55 mn.

β) Gradient pour les OPG neutres

La séparation est effectuée en utilisant une solution de soude 150 mM comme éluant 1 et une solution de soude 150 mM contenant 500 mM d'acétate de sodium comme éluant 2. Le gradient utilisé consiste en (a) 50 mM de NaOAc dans la soude 150 mM pendant 5 mn et (b) un gradient linéaire variant de 50 à 200 mM de NaOAc en 35 mn.

b) Chromatographie à pH 5,5

La séparation est effectuée en utilisant une solution d'eau milli-Q comme éluant 1 et une solution d'acide acétique 3 % tamponnée à pH 5,5 avec de la soude comme éluant 2. Le gradient utilisé consiste en (a) 0,5 % d'AcONa pH 5,5 pendant 5 mn et (b) un gradient linéaire variant de 0,5 % à 1,2 % en 30 mn. L'ajout de soude sous la forme d'additif post-colonne est nécessaire, à pH 5,5, pour la détection PAD.

Fiche technique n°6

1) Analyse des OPG par spectrométrie de masse

a) Spectrométrie de masse en mode FAB

Les analyses en FAB-MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse 4 secteurs Kratos Concept II HH à haute résolution (Kratos, Manchester, UK), équipé d'un système de données DS90 (DG:DG 30). L'appareil opère avec un système d'accélération de 8 keV. Le canon à atomes rapides est utilisé avec du xénon comme gaz de bombardement dans les conditions suivantes : 7 kv-1mA. Les masses sont balayées de $m/z = 3000$ à 400 à raison de 30 secondes par décades avec une résolution de masse égale à 1000. En mode négatif, la matrice utilisée est le thioglycérol saturé en triéthylamine à 50 % dans l'eau. En mode positif, la matrice utilisée consiste en 0,5 % acétate de sodium dans le thioglycérol.

b) Spectrométrie de masse en mode ionisation/désorption laser

Les analyses en MALDI-TOF ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à temps de vol Vision 2000 (FinniganMAT, Bremen, Germany) ou Lamma1000 (Leybold Heraeus, Cologne, Germany). Un laser à azote (Laser Science Inc., Cambridge, MA, USA) avec une émission de 337 nm et une durée de 3 ns. Les ions sont accélérés à une énergie de 3 keV (LAMMA1000) ou de 10 keV (VISION 2000) avant l'entrée dans le spectromètre en temps de vol. Les ions sont accélérés de nouveau à une énergie cinétique de 20 keV. Les matrices pour l'analyse des OPG sont les suivantes : acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (10 g/l dans l'eau) et 3-aminoquinoline (AQU) (10 g/l dans l'eau). Les spectres ont été calibrés en utilisant des dextrans (matrice DHB) ou des mélanges de peptides (matrice AQU). Les OPG lyophilisés sont dissout dans de l'eau distillée pour donner une concentration de 1 à 2 g/l avant l'analyse par MALDI-MS. Les OPG ont été mélangés avec la matrice dans un rapport 1:2-1:10 (v/v). Approximativement 0,5-1 μ l du mélange est déposé sur une plaque de métal poli qui est transférée dans le spectromètre de masse.

Fiche technique n°7

1) Analyse par résonance magnétique nucléaire des OPG

Préalablement à l'analyse, les OPG sont traités deux fois avec du $^2\text{H}_2\text{O}$ à température ambiante. Après chaque échange, les OPG sont lyophilisés. Finalement, les échantillons sont dissous dans 0,5 ml de $^2\text{H}_2\text{O}$. Les spectres ont été obtenus avec un spectromètre Bruker AM-300, Bruker AM-400 ou Bruker DMX-600. Les spectres ont été réalisés à une température de 25°C ou de 28°C. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport à celui de l'acétone comme standard interne ($\delta\text{H} = 2,225$ et $\delta\text{C} = 31,55$ ppm). Les expériences de RMN homonucléaire en deux dimensions COSY, COSY simple relai, COSY double relai, TOCSY et NOESY et de RMN hétéronucléaire en deux dimensions HSQC, HSQC-NOESY et HSQC-TOCSY ont été effectués grâce aux séquences standards de Bruker. Les spectres ont été acquis avec 1024 x 256 points complexes. Les spectres HSQC-NOESY ont été acquis avec des temps de mélange variants de 100 à 300 ms, les spectres HSQC-TOCSY ont été acquis avec un temps de mélange de 100 ms et les spectres HMBC ont été acquis avec un délai de 100 ms correspondant à l'évolution de la constante de couplage ($^3\text{J } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$) de 5 Hz.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbe, M., A. Amemura, and S. Higashi. 1982. Studies on cyclic β -(1,2)-glucan obtained from periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. *Plant Soil* **64**:315-354.
- Altabe, S. G., N. Iñón de Iannino, D. de Mendoza, and R. A. Ugalde. 1994. New osmoregulated β (1,3), β (1,6) glucosyltransferase in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **176**:4890-4898.
- Altabe, S. G., N. Iñón de Iannino, D. de Mendoza, and R. A. Ugalde. 1990. Expression of the *Agrobacterium tumefaciens chvB* virulence region in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* **172**: 2563-2567.
- Amemura, A. 1984. Synthesis of (1,2)- β -D-glucan by cell-free extracts of *Agrobacterium radiobacter* IFO 12665b1 and *Rhizobium phaseoli* AHU 1133. *Agric. Biol. Chem.* **48**:1809-1817.
- Amemura, A., and J. Cabrera-Crespo. 1986. Extracellular oligosaccharides and Low- M_r polysaccharides containing (1,2)- β -D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2443-2452.
- Amemura, A., M. Hisamatsu, H. Mitani, and T. Harada. 1983. Cyclic (1-2)- β -D-glucan and the octasaccharide repeating-units of extracellular acidic polysaccharides produced by *Rhizobium*. *Carbohydr. Res.* **114**:277-285.
- Amemura, A., T. Hashimoto, K. Koizumi, and T. Utamura. 1985. Occurrence of extracellular (1,2)- β -D-glucans and (1,2)- β -D-gluco-oligosaccharides in *Acetobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:301-307.
- Ammerall, R. N., G. A. Delgado, F. L. Tenbarger, and R. B. Friedman. 1991. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection of linear and branched glucose oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **215**:179-192.
- Anderson, D. M., and D. Mills. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* **75**:104-108.
- André, I., K. Mazeau, F. R. Taravel, and I. Tvaroska. 1995a. NMR and molecular modelling of sophorose and sophotriose in solution. *New J. Chem.* **19**:331-339.
- André, I., K. Mazeau, F. R. Taravel, and I. Tvaroska. 1995b. Conformation and dynamics of a cyclic (1,2)- β -D-glucan. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**:189-198.
- Arwiyanto, A., M. Goto, S. Tsuyumu, and Y. Takinawa. 1994. Biocal control of bacterial wilt tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **60**:421-430.
- Barreto-Bergter, E., C. R. Camargo, L. R. Hogge, and P. A. J. Gorin. 1980. Minor structures in β -(1,2)-linked D-glucopyranans from *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium radiobacter*. *Carbohydr. Res.* **82**:366-371.
- Batley, M., J. W. Redmond, S. P. Djordjevic, and B. G. Rolfe. 1987. Characterization of glycerophosphorylated cyclic β -1,2-glucans from a fast-growing *Rhizobium* species. *Biochim. Biophys. Acta* **901**:119-126.
- Benincasa, M., G. P. Cartoni, F. Coccioli, R. Rizzo, and L. P. T. M. Zevenhuizen. 1987. High-performance liquid chromatography of cyclic β -(1,2)-D-glucans (cyclosophoraoses) produced by *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *J. Chromatogr.* **393**:263-271.

- Beveridge, T. J., and L. L. Graham. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**:684-705.
- Bhagwat, A. A., and D. L. Keister. 1995. Site-directed mutagenesis of the β -(1,3);(1,6)-D-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:366-370.
- Bhagwat, A. A., R. E. Tully, and D. L. Keister. 1992. Isolation and characterization of an *ndvB* locus from *Rhizobium fredii*. *Mol. Microbiol.* **6**:2159-2165.
- Bock, K., J. Schuster-Kolbe, E. Altman, G. Allmaier, B. Stahl, R. Christian, U. B. Sleytr., and P. Messner. 1994. Primary structure of the O-glycosidically linked glycan chain of the crystalline surface layer glycoprotein of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69. *J. Biol. Chem.* **269**:7139-7144.
- Bohin, J.-P., and E. P. Kennedy. 1984a. Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**:956-957.
- Bohin, J.-P., and E. P. Kennedy. 1984b. Regulation of the synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. Assay of phosphoglycerol transferase I *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **259**:8388-8393.
- Breedveld, M. W., A. J. Benesi, M. L. Marco, and K. J. Miller. 1995a. Effect of phosphate limitation on synthesis of periplasmic cyclic β -(1,2)-glucans. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1045-1053.
- Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**:145-161.
- Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1995. Synthesis of glycerophosphorylated cyclic (1,2)- β -glucans in *Rhizobium meliloti* strain 1021 after osmotic shock. *Microbiology.* **141**:583-588.
- Breedveld, M. W., J. A. Hadley, and K. J. Miller. 1995b. A novel β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**:6346-6351.
- Breedveld, M. W., J. S. Yoo, V. N. Reinhold, and K. J. Miller. 1994. Synthesis of glycerophosphorylated cyclic β -(1,2)-glucans by *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **176**:1047-1051.
- Breedveld, M. W., L. P. T. Zevenhuizen, and A. J. B. Zehnder. 1992. Synthesis of cyclic β -(1,2)-glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* **174**:6336-6342.
- Bundle, D. R., K. W. Cherwonogrodzky, and M. B. Perry. 1988. Characterization of *Brucella* polysaccharide. *J. Infect. Immun.* **56**:1101-1106.
- Cangelosi, G. A., G. Martinetti, and E. W. Nester. 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lacks periplasmic β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**:2172-2174.
- Cangelosi, G. A., G. Martinetti, J. A. Leigh, C. Chang Lee, C. Theines, and E. W. Nester. 1989. Role for *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **171**:1609-1615.

- Chatterjee, D., C. M. Bozic, M. Mc Neil, and P. J. Brennan. 1991. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **266**:9652-9660.
- Cohen, J. L., and K. J. Miller. 1991. A novel membrane-bound glucosyltransferase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **173**:4271-4276.
- De Maagd, R. A., A. S. Rao, I. H. M. Mulders, L. Goosen-de Roo, M. C. M. van Loosddrecht, C. A. Wijffelman, and B. J. J. Lugtenberg. 1989. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides : possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from infection thread. *J. Bacteriol.* **171**:1143-1150.
- Debarbieux, L. 1995. Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli* : analyse topographique et étude de l'expression de la glucosyl-transférase membranaire MdoH. Analyse topographique de la protéine SpoIIGA de *Bacillus subtilis*. Thèse de Docteur en Sciences. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Delcour, A. H., J. A. Adler, C. Kung, and B. Martinac. 1992. Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *E. coli* porin channel. *FEBS Lett.* **304**:216-220.
- Dell, A., W. S. York, M. McNeil, A. G. Darvill, and P. Albersheim. 1983. The cyclic structure of β -D-(1,2)-linked D-glucans secreted by *Rhizobia* and *Agrobacteria*. *Carbohydr. Res.* **117**:185-200.
- Denny, T. P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **58**:145-161.
- Douglas, C. J., R. J. Staneloni, R. A. Rubin, and E. W. Nester. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**:850-860.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* **28**:350-356.
- Dubourdieu, D., P. Ribereau-Gayon, and B. Fournet. 1981. Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cineria*. *Carbohydrate Res.* **93**:294-299.
- Dylan, T., D. R. Helinski, and G. S. Ditta. 1990a. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1,2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**:1400-1408.
- Dylan, T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas, M. Yanofsky, E. Nester, D. R. Helinski, and G. Ditta. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4403-4407.
- Dylan, T., P. Nagpal, D. R. Helinski, and G. S. Ditta. 1990b. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**:1409-1417.
- Fiedler, W., and H. Roterling. 1985. Characterization of an *Escherichia coli mdoB* mutant strain unable to transfer *sn*-1-phosphoglycerol to membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **260**:4799-4806.
- Fiedler, W., and H. Roterling. 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:14684-14689.

- Fournet, B., G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil.** 1981. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* **116**:489-502.
- Garozzo, D., E. Spina, L. Sturiale, G. Montaudo, and R. Rizzo.** 1994. Quantitative determination of β -(1,2) cyclic glucans by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **8**:358-360.
- Geiger, O., A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy.** 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **173**:3021-3024.
- Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1-2) glucans. *J. Bacteriol.* **169**:880-884.
- Goldberg, D. E., M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1981. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: A periplasmic phosphoglyceroltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 5513-5517.
- Goosen-de Roo, L., R. A. De Maagd, and B. J. J. Lugtenberg.** 1991. Antigenic changes in lipopolysaccharide I of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in root nodules of *vicia sativa* subsp. *nigra* occur during release from infection threads. *J. Bacteriol.* **173**:3177-3183.
- Harkness, R. E., and V. Braun.** 1989a. Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* **264**:6177-6182.
- Harkness, R. E., and V. Braun.** 1989b. Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* **264**:14716-14722.
- Harkness, R. E., W. Fiedler, and V. Braun.** 1990. Lack of inhibition by colicin M suggests bactoprenol independence of MDO biosynthesis. *FEBS Lett.* **262**:245-248.
- Hartmann, E., P. Messner, G. Allmeier, and H. König.** 1993. Proposed pathway for biosynthesis of the S layer glycoprotein of *Bacillus alvei*. *J. Bacteriol.* **175**:4515-4519.
- Hillenkamp, F., and M. Karas.** 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* **193**:280-295.
- Hisamatsu, M.** 1992. Cyclic (1-2)- β -D-glucan (cyclosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**:137-146.
- Hisamatsu, M., A. Amemura, K. Koizumi, T. Utamura, and Y. Okada.** 1983. Structural studies on cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclosophoraoses) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Carbohydr. Res.* **121**:31-40.
- Hisamatsu, M., T. Yamada, T. Higashiura, and M. Ikeda.** 1987. The production of acidic, o-acylated cyclosophorans [cyclic (1-2)- β -D-glucans] by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**:115-122.
- Höltje, J.-V., W. Fiedler, H. Roterich, B. Walderich, and J. van Duin.** 1988. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:3539-3541.
- Ielpi, L., T. Dylan, G. S. Ditta, D. R. Helinski, and S. W. Stanfield.** 1990. The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of β -(1,2)-glucan. *J. Biol. Chem.* **265**:2843-2851.

- Iñón de Iannino, N., and R. A. Ugalde.** 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -(1,2) glucan. *J. Bacteriol.* **171**:2842-2849.
- Iñón de Iannino, N., and R. A. Ugalde.** 1993. Biosynthesis of cyclic β -(1-3), β -(1-6) glucan in *Bradyrhizobium* spp. *Arch. Microbiol.* **159**:30-38.
- Jackson, B. J., and E. P. Kennedy.** 1983. The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a membrane-bound phosphoglycerol transferase. *J. Biol. Chem.* **258**:2394-2398.
- Jackson, B. J., J.-P. Bohin, and E. P. Kennedy.** 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* **160**:976-981.
- Jansson, E. E., L. Kenne, and B. Lindberg.** 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **45**:275-282.
- Kennedy, E. P.** 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1092-1095.
- Kennedy, E. P.** 1987. Membrane-derived oligosaccharides. p. 672-679. *In* F. C. Neidhart, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kennedy, E. P., M. K. Rumley, H. Schulman, and L. M. G. Van Golde.** 1976. Identification of *sn*-glycerol-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**:4208-4213.
- Kingsley, M. T., D. W. Gabriel, G. C. Marlow, and P. D. Roberts.** 1993. The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* **175**:5839-5850.
- Kinoshita, S., M. Nakata, A. Amemura, and H. Taguchi.** 1991. Purification of cyclic β -1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium radiobacter*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**:416-421.
- Knirel, Y. A., A. S. Shashkov, N. A. Paramonov, G. M. Zdorovenko, L. P. Solyanic, and L. M. Yakovleva.** 1993. Somatic antigens of pseudomonads: structure of the O-specific polysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. tomato 140(R). *Carbohydr. Res.* **243**:199-204.
- Koizumi, K., Y. Kubota, T. Tanimoto, and Y. Okada.** 1988. Determination of cyclic glucans by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.* **45**:303-310.
- Koizumi, K., Y. Okada, S. Horiyama, and T. Utamura.** 1983. Separation of cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclosophoraoses) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*, and determination of their degree of polymerisation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **265**:89-96.
- Koizumi, K., Y. Okada, T. Utamura, M. Hisamatsu, and A. Amemura.** 1984. Further studies on the separation of cyclic (1,2)- β -D-glucans (cyclosophoraoses) produced by *Rhizobium meliloti* IFO 13336, and determination of their degrees of polymerization by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **299**:215-224.

- 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, and J.-P. Bohin.** 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* **5**:1745-1753.
- Lacroix, J.-M., M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin.** 1989. Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**:1173-1182.
- Lanfroy, E., and J.-P. Bohin.** 1993. Physical map location of the *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I. *J. Bacteriol.* **175**:5736-5737.
- Leigh, J. A., E. R. Signer, and G. C. Walker.** 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:6231-6235.
- Leigh, J.A., J. W. Reed, J. F. Hanks, A. M. Hirsch, and G. C. Walker.** 1987. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell.* **51**:579-587.
- Lepek, V., Y. Navarro de Navarro, and R. A. Ugalde.** 1990. Synthesis of $\beta(1-2)$ -glucan in *Rhizobium loti*. Expression of *Agrobacterium chvB* virulence region. *Arch. Microbiol.* **15**:35-41.
- Long, S. R., and B. J. Staskawicz.** 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell* **73**:921-935.
- Lopez-Lara, I. M., G. Orgambide, F. B. Dazzo, J. Olivares, and N. Toro.** 1993. Characterization and symbiotic importance of acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium* sp. strain GRH2 isolated from acacia nodules. *J. Bacteriol.* **175**:2826-2832.
- Loubens I., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix and J.-P. Bohin.** 1993a. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329-340.
- Loubens, I., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohin.** 1993b. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K12. p. 491-496. In M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph, and J. G. Swings. (Ed.), *Plant Pathogenic Bacteria*, June 9-12, 1992, Versailles, France, INRA Press, Paris.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- McNeil, M., M. Daffé, and P. I. Brennan.** 1990. Evidence of the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* **265**:18200-18206.
- McNeil, M., M. Daffé, and P. I. Brennan.** 1991. Location of the mycoloyl ester substituents in the cell wall of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **266**:13217-13223.
- Miller, K. J., and E. P. Kennedy.** 1987. Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the Membrane-Derived Oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:682-686

- Miller, K. J., and R. S. Gore. 1992. Cyclic β -1,6 -1,3 glucans of *Bradyrhizobium*: functional analogs of the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium*? *Curr. Microbiol.* **24**:101-104.
- Miller, K. J., E. P. Kennedy, and V. N. Reinhold. 1986. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**:48-51.
- Miller, K. J., R. S. Gore, and A. J. Benesi. 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**:4569-4575.
- Miller, K. J., R. S. Gore, R. Johnson, A. J. Benesi, and V. N. Reinhold. 1990. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **172**:136-142.
- Miller, K. J., V. N. Reinhold, A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy. 1987. Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. *Biochim. Biophys. Acta* **901**:112-118.
- Mills, D., and F. Niepold. 1987. Molecular analysis of pathogenesis of *P. syringae* pv. *syringae*, p. 185-200. *In* S. Nishimura, C. P. Vance, and N. Doke (ed.), *Molecular determinants of plant diseases*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Mills, D., and P. Mukhopadhyay. 1990. Organization of the *hrpM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis, p. 47-57. *In* S. Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mock, K. K., M. Davey, and J. S. Cottrell. 1991. The analysis of underivatized oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**:644-651.
- Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik, and G. Strecker. 1986. Glycoproteins, p. 143-204. *In* M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate analysis: a practical approach*. IRL Press, Inc., Washington, D.C.
- Morris, V. J. 1991. Bacterial polysaccharides for use in food and agriculture, p 135-146. *in* C. G. Gebelein (ed.). *Biotechnology and polymers*. Plenum Press, New York.
- Morris, V. J. 1992. Bacterial polysaccharides. *Agro-Food Ind. Hi-Tech.* **1**:3-8.
- Mukhopadhyay, P., J. Williams and D. Mills. 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **170**:5479-5488.
- Nagpal, P., S. P. S. Khanuja, and S. W. Stanfield. 1992. Suppression of the *ndv* mutant phenotype of *Rhizobium meliloti* by cloned *exo* genes. *Mol. Microbiol.* **6**:479-488.
- Newman, M. A., J. Conrads-Strauch, G. Scofield, M. J. Daniels, and J. M. Dow. 1994. Defence-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:553-562.
- Olsen, G. J., C. R. Woese, and R. Overbeek. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**:1-6.
- Orgambide, G., H. Montrozier, P. Servin, J. Roussel, D. Trigalet-Demery, and A. Trigalet. 1991. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **266**:8312-8321.

- Palleroni, N. J.** 1992. Present situation of the taxonomy of aerobic Pseudomonads, p. 105-115. in S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Palleschi, A., and V. Crescenzi.** 1985. On a possible conformation of cyclic $\beta(1,2)$ -D-glucans. *Gazz. Chim. Ital.* **115**:243-245.
- Paul, G., and F. Wiedland.** 1987. Sequence of the halobacterial glucosaminoglycan. *J. Biol. Chem.* **262**:9587-9593.
- Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, and G. Ricard.** 1984. A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**:41-47.
- Poppe, L., W. S. York, and H. van Halbeek.** 1993. Measurement of inter-glycosidic ^{13}C - ^1H coupling constants in a cyclic β -(1,2)-glucan by ^{13}C -filtered 2D $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ ROESY. *J. Biomol. NMR* **3**:81-89.
- Puvanesarajah, V., F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, and E. W. Nester.** 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**:102-106.
- Puzo, G.** 1993. La paroi mycobactérienne : structure et organisation des glycoconjugués majeurs. *Ann. Inst. Pasteur* **4**:225-238.
- Raina, S., R. Raina, T. V. Venkatesh, and H. K. Das.** 1995. Isolation and characterization of a locus from *Azospirillum brasilense* Sp7 that complements the tumorigenic defect of *A. tumefaciens chvB* mutant. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **8**:322-326.
- Reinhold, B. H., S. Y. Chan, T. L. Reuber, A. Marra, G. C. Walker, and V. N. Reinhold.** 1994. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* RM1021. *J. Bacteriol.* **176**:1997-2002.
- Reuber, T. L., and G. C. Walker.** 1993a. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**:269-280.
- Reuber, T. L., and G. C. Walker.** 1993b. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm 1021. *J. Bacteriol.* **175**:3653-3655.
- Reuber, T. L., S. Long, and G. C. Walker.** 1991. Regulation of *Rhizobium meliloti* *exo* genes in free-living cells and *in planta* examined by using *TnphoA* fusions. *J. Bacteriol.* **173**:426-434.
- Rolin, D. B., P. E. Pfeffer, S. F. Osman, B. S. Szwegold, F. Kappler, and A. J. Benesi.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted β -1,6 -1,3 macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**:215-225.
- Rosenfeld, L., and C. E. Ballou.** 1974. Acetolysis of disaccharides: comparative kinetics and mechanisms. *Carbohydr. Res.* **32**:287-298.
- Rotering, H., W. Fiedler, W. Rollinger, and V. Barun.** 1984. Procedure of the identification of *Escherichia coli* mutants affected in components containing glycerol derived from phospholipid turnover: isolation of mutants lacking glycerol in membrane-derived oligosaccharides (MDO). *FEMS Microbiol. Lett.* **22**:61-68.

- Rumley, M. K., H. Therisod, A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy. 1992. Mechanisms of regulation of the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:11806-11810.
- Schneider, J. E., V. Reinhold, M. K. Rumley, and E. P. Kennedy. 1979. Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**:10135-10138.
- Schulman, H., and E. P. Kennedy. 1977. Identification of UDP-Glucose as an intermediate in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 6299-6303.
- Schulman, H., and E. P. Kennedy. 1979. Localization of membrane-derived oligosaccharides in the outer membrane of *Escherichia coli* and their occurrence in other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **137**:686-688.
- Serrano, A. M., G. Franco-Rodriguez, I. Gonzalez-Jimenez, P. Tejero-Mateo, J. M. Molina, J. A. Dobado, M. Megias, and M. J. Romero. 1993. The structure and molecular mechanics calculations of the cyclic (1-2)- β -D-glucan secreted by *Rhizobium Tropici* CIAT 899. *J. Mol. Struct.* **301**:211-226.
- Stahl, B., M. Steup, M. Karas, and F. Hillenkamp. 1991. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **63**:1463-1466.
- Stahl, B., S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, and G. Sawatzki. 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **223**:218-226.
- Stanfield, S. W., L. Ielpi, D. O'Brochta, D. R. Hlinski, and G. S. Ditta. 1988. The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1,2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* **170**:3523-3530.
- Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman. 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**:7850-7861.
- Sutherland, I. W. 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.* **113**:187-2310
- Swart, S., B. J. J. Lugtenberg, G. Smit, and J. W. Kijne. 1994. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *J. Bacteriol.* **176**:3816-3819.
- Swart, S., G. Smit, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne. 1993. Restoration of attachment, virulence and nodulation of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants by rhicadhesin. *Mol. Microbiol.* **10**:597-605.
- Th erisod, H., A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy. 1986. An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:7236-7240.
- Th erisod, H., and E. P. Kennedy. 1987. The function of acyl carrier protein in the synthesis of membrane-derived oligosaccharides does not require its phosphopantetheine prosthetic group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:8235-8238.

- Townsend, R. R., M. R. Hardy, and Y. C. Lee.** 1989. Separation of oligosaccharides using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Methods Enzymol.* **179**:65-76.
- Townsend, R. R., M. R. Hardy, D. A. Cumming, J. P. Carver, and B. Bendiak.** 1989. Separation of branched sialylated oligosaccharides using high-performance chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* **182**:1-8.
- Usui, T., N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama, and S. Seto.** 1973. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* **1**:2425-2432.
- Van Golde, L. M. G., H. Schulman, and E. P. Kennedy.** 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:1368-1372.
- Weissborn, A. C., and E. P. Kennedy.** 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of β -1,2-linked polyglucose chains. *J. Biol. Chem.* **259**: 12644-12651.
- Weissborn, A. C., M. K. Rumley, and 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.
- Williamson, G., K. Damani, P. Devenney, C. B. Faulds, V. J. Morris, and B. J. H. Stevens.** 1992. Mechanism of action of cyclic β -1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: Competition between cyclization and elongation reactions. *J. Bacteriol.* **174**:7941-7947.
- Willis, D. K., J. J. Rich, and E. M. Hrabak.** 1991. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **4**:132-138.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archae, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4576-4579.
- Yanisch-Perron, C., J. Viera, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- York, W. S., J. U. Thomsen, and B. Meyer.** 1993. The conformations of cyclic (1-2)- β -D-glucans: Application of multidimensional clustering analysis to conformational data sets obtained by Metropolis Monte Carlo calculations. *Carbohydr. Res.* **248**:55-80.
- York, W. S., M. McNeil, A. G. Darvill, and P. Albersheim.** 1980. β -1,2-linked glucans secreted by fast-growing species of *Rhizobium*. *J. Bacteriol.* **142**:243-248.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., A. Van Veldhuizen, and R. H. Fokkens.** 1990. Re-examination of cellular β -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-1-phosphate substitution. *Antonie Leeuwenhoek* **57**:173-178.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., and H. J. Scholten-Koerselman.** 1979. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. I. β -1,2-Glucans. *Antonie Leeuwenhoek* **45**:165-175.
- Zorreguieta, A., R. A. Ugalde, and L. F. Leloir.** 1985. An intermediate in cyclic β -1,2-glucan biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:352-357.

- Zorreguita, A., and R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1,2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**:947-951.
- Zorreguita, A., S. Cavaignac, R. A. Geremia, and R. A. Ugalde.** 1990. Osmotic regulation of β (1,2) glucan synthesis in members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **172**:4701-4704.

RESUME

INTRODUCTION

Les composants de l'enveloppe bactérienne jouent un rôle important dans la mise en place de la relation bactérie-hôte. Parmi ceux-ci, les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des constituants généraux des bactéries à Gram négatif possédant en commun les propriétés suivantes : 1) le glucose est le seul sucre constitutif ; 2) ils sont localisés dans le périplasma ; 3) leur synthèse est sous la dépendance de l'osmolarité du milieu et d'autant plus forte que celle-ci est basse.

Les OPG peuvent être cycliques, ou linéaires et branchés. Chez *Escherichia coli*, les OPG, connus sous le nom de MDO (pour Membrane Derived Oligosaccharides), sont composés d'un nombre de résidus de glucose variant de 6 à 12 par molécule. La structure s'organise autour d'un squelette de résidus de glucose liés en β -1,2 sur lequel les branches en β -1,6 viennent s'attacher et la structure est hautement branchée. Les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiacées* synthétisent des OPG cycliques. Les espèces *Agrobacterium* et *Rhizobium* synthétisent des OPG de structures similaires composés de 17 à 24 résidus de glucose liés en β -1,2. Des extraits de *Bradyrhizobium japonicum* révèlent la présence d'OPG cycliques liés en β -1,3 et en β -1,6 composés de 10 à 13 résidus de glucose par molécule.

Les OPG peuvent être substitués. Chez *E. coli*, ces composés sont hautement substitués par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, de phosphoéthanolamine (provenant tous deux des phospholipides membranaires), ou bien encore par des résidus de succinate dont l'origine reste inconnue. Les OPG des *Rhizobiacées* sont substitués, à des taux variables, par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol. Les OPG de *B. japonicum* peuvent être substitués par des résidus de phosphocholine.

On pense que les OPG des *Rhizobiacées* jouent un rôle important dans l'interaction de ces bactéries avec leur hôte spécifique. En effet, les mutants d'*A. tumefaciens* ne synthétisant plus d'OPG sont avirulents, et les mutants correspondants de *R. meliloti* et de *B. japonicum* stimulent la formation de nodules chez la luzerne et le soja respectivement, mais ceux-ci sont inefficaces car vides de bactéroïdes.

Loubens et coll. ont découvert une homologie considérable entre l'opéron *hrpM* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* et l'opéron *mdoGH* d'*E. coli*, qui est impliqué dans la biosynthèse du MDO (70 % d'identité entre les séquences nucléotidiques). MdoH est une protéine traversant la membrane interne qui fait partie du système glucosyl-transférase responsable de la formation de chaînes de glucose liées en β -1,2. La souche *hrpM* de *P. syringae* n'est pas

virulente ; elle ne provoque aucun flétrissement chez le haricot, la plante hôte, ni de réponse hypersensible chez les plantes non-hôtes, contrairement à la souche sauvage. Cette grande homologie pouvait faire penser que ces gènes ont des fonctions similaires chez les deux organismes. Ceci a été partiellement prouvé car l'introduction dans une souche *mdoH* d'*E. coli* d'un plasmide portant la deuxième phase de lecture du locus de pathogénicité *hrpM* de *P. syringae* restaure la capacité de biosynthèse des glucanes périplasmiques. De plus, les mutants *hrpM* de *P. syringae* sont dépourvus de glucanes périplasmiques.

L'étude structurale des OPG a été effectuée principalement en analysant ces composés par chromatographie à haute performance d'échanges d'anions, spectrométrie de masse en mode FAB ou MALDI-TOF, et par RMN du ^1H et du ^{13}C , homonucléaire et hétéronucléaire.

1) Homologie fonctionnelle entre HrpM et MdoH.

La structure des OPG produits dans *E. coli* grâce à sa propre glucosyl-transférase (MdoH) est identique à celle des OPG produits dans *E. coli* grâce à la glucosyl-transférase de *P. syringae* (HrpM). De plus, l'introduction d'un plasmide navette portant l'opéron *mdoGH* dans une souche mutante *hrpM* de *P. syringae* restaure la capacité de synthèse des OPG, ainsi que le phénotype de virulence. Ces complémentations interspécifiques entre les gènes de biosynthèse des glucanes de ces deux bactéries montrent bien que l'identité structurale est accompagnée d'une identité fonctionnelle.

2) Les glucanes périplasmiques de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Les OPG de *P. syringae* jouent un rôle dans les processus d'infection de la plante. Ces composés sont constitués uniquement de glucose et formés de 6 à 13 résidus de glucose par molécule, le nombre moyen étant de 9 résidus de glucose par molécule. Les structures sont hautement branchées ; les molécules sont organisées en une chaîne linéaire de résidus liés en β -1,2 sur laquelle les branches, formées d'un seul résidu, sont attachées en β -1,6. Nous pouvons donc dire que les OPG de *P. syringae* sont similaires à ceux d'*E. coli*. Toutefois, une différence majeure est qu'ils ne sont absolument pas substitués, contrairement au MDO qui possède un très fort caractère anionique (J. Bacteriol. (1994) 176:6538-6544).

3) Les glucanes périplasmiques d'*Erwinia chrysanthemi*.

Erwinia chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène très proche d'*E. coli*, qui provoque la pourriture molle de nombreuses plantes, aussi bien monocotylédones que dicotylédones. Les OPG d'*E. chrysanthemi* sont très semblables à ceux d'*E. coli* (5 à 12 résidus de glucose par molécule) et ils s'organisent autour d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 branchée en β -1,6. Les OPG d'*E. chrysanthemi* sont substitués à un faible taux par du succinate ; le taux de substitution varie en fonction de l'osmolarité du milieu de culture, ce qui n'a jamais été observé chez *E. coli*. Les OPG d'*E. chrysanthemi*, de *P. syringae* et d'*E. coli* sont donc fortement semblables, seuls différent les substituants présents. *E. chrysanthemi* doit donc posséder une glucosyl-transférase proche de celle de *P. syringae* et d'*E. coli*. Ceci a été récemment démontré au laboratoire par le clonage et le séquençage nucléotidique de l'opéron responsable de la synthèse des OPG d'*E. chrysanthemi*, fortement homologue à *mdoGH*.

4) Les glucanes périplasmiques de *Burkholderia solanacearum* et de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

Les résultats précédemment obtenus indiquent que la structure des OPG semble être plus liée à la position des bactéries sur l'arbre phylogénétique qu'à une relation stricte structure-fonction. Pour étayer cette hypothèse, j'ai étudié la structure des OPG synthétisés par *Burkholderia solanacearum* et par *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Ces deux bactéries ont été choisies car ce sont des bactéries pathogènes de très nombreuses plantes d'importances majeures pour l'agriculture. J'ai montré que *B. solanacearum* et *X. campestris* synthétisent des OPG cycliques de taille homogène (13 et 16 résidus de glucose, respectivement). Ils ne sont pas du tout substitués. Les études par RMN à 600 MHz montrent la présence d'une liaison unique α -1,6, tandis que les autres résidus de glucose sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,2. La présence de cette liaison α -1,6 induit de telles contraintes stériques au sein de ce cycle que les signaux de tous les résidus de glucose sont indépendants. A partir des signaux des protons anomériques nous avons pu établir l'ordre d'enchaînement de chacun des résidus de glucose pour les deux molécules. La structure de ces OPG contraste fortement avec la structure des OPG précédemment décrits. Cette analyse constitue la première étape de l'étude de ces composés dans les processus d'infection de la plante.

5) Les OPG de *Rhodobacter sphaeroides*.

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie photosynthétique facultative. Après une réduction de la pression partielle en oxygène, une série d'invaginations de la membrane cellulaire permet la formation de membranes intracytoplasmiques, spécialisées dans une photosynthèse anoxygénique.

R. sphaeroides synthétise des OPG cycliques fortement homologues à ceux synthétisés par *B. solanacearum* et de *X. campestris*. Le squelette glucosidique de ces OPG est homogène en taille: 18 résidus de glucose par molécule, liés par l'intermédiaire d'une liaison α -1,6 tandis que les autres résidus sont liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,2. Il est substitué, à un très fort taux, par des résidus de succinate. Comme précédemment, l'ordre séquentiel des résidus de glucose a été établi.

6) Les OPG d'*Azospirillum brasilense*

Les bactéries du genre *Azospirillum* sont étudiées car elles facilitent la croissance des plantes. Ces bactéries peuvent, sous certaines conditions, coloniser la rhizosphère. Altabe et coll. avaient publié qu'*Azospirillum brasilense* synthétise des OPG non substitués, liés par l'intermédiaire de liaisons β -1,3 et β -1,6 et possédant une moyenne de 10 résidus de glucose par molécule (J. Bacteriol. (1994) 172:2563-2567). Un réexamen, effectué en collaboration avec ces auteurs, nous a permis de démontrer au contraire leur caractère cyclique, possédant 12 et 13 résidus de glucose par molécule et qu'ils peuvent être substitués par un résidu de succinate.

Conclusion

Les études de structure des OPG montrent bien la biodiversité de ces composés. Chaque espèce de protéobactérie synthétise un seul type d'OPG. Si l'on considère que ces composés jouent un rôle commun au sein de la cellule bactérienne, il devient plus difficile d'établir une relation entre structure et fonction. Par exemple, les OPG impliqués dans la phytopathogénicité ne sont pas systématiquement cycliques, contrairement à ce que l'on avait déduit des études menées chez les Rhizobiacées. De plus, les OPG synthétisés par *B. solanacearum*, *X. campestris* et *R. sphaeroides* font partie d'une autre famille de glucanes qui possèdent de nouvelles caractéristiques

structurales. Cette nouvelle famille d'OPG est présente chez des bactéries classées aujourd'hui dans les trois subdivisions des protéobactéries (gamma pour *X. campestris*, bêta pour *B. solanacearum* et alpha pour *R. sphaeroides*). Ainsi, il semble que la diversité structurale de ces molécules ne recouvre pas exactement les divisions phylogénétiques établies sur la base de la comparaison des séquences primaires des ARN ribosomiques. Si on privilégie une évolution à partir de gènes ancestraux communs, il faut en conclure que la classification actuelle n'est pas valide. L'alternative serait que les gènes de synthèse des OPG aient été transmis horizontalement.

