

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

Frédéric PAGE

SUJET : Les glucanes périplasmiques osmorégulés d' *Erwinia chrysanthemi* et *Escherichia coli* : relation avec la phytopathogénicité et régulation génétique de la biosynthèse.

Soutenue le 09 Décembre 1998 devant la commission d'examen

Président	M. Steven Ball
Rapporteurs	M. Frédéric Barras M. Jean-Claude Lazzaroni
Examineurs	Mme Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat M. Jean-Pierre Bohin



A Mélanie,

Je remercie le professeur Jean-Pierre Bohin de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir permis de préparer cette thèse. Je lui sais gré de m'avoir inculqué un peu de sa rigueur scientifique, de son érudition et de sa persévérance.

Je remercie Messieurs Steven Ball, Frédéric Barras et Jean-Caude Lazzaroni et Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat d'avoir accepté de juger ce travail, je suis très sensible à l'honneur qu'ils me font.

Merci à tous les membres de l'ex 002, en particulier Jean-Marie Lacroix, qui a codirigé une grande partie de cette thèse et m'a initié à la paillasse et à l'enseignement, et Silvia Altabe qui m'a beaucoup appris lors de sa très importante participation à ce travail.

Je tiens à adresser un remerciement tout particulier à Eric et Laurent, qui m'ont permis de progresser grâce à leurs conseils et leur soutien. Merci à Laurent pour son optimisme à toute épreuve et surtout pour sa capacité à concilier avec le sourire sa maniaquerie au désordre chronique de ma paillasse. Merci à Eric d'avoir eu la patience de m'initier à l'informatique malgré mon incompetence.

Un grand merci à Anne pour sa disponibilité, son soutien et son aide, à Philippe pour mon initiation à la biochimie des sucres, à Mohamed pour sa joie de vivre communicative et ses cours d'arabe, à Sabine pour m'avoir enseigné quelques uns de ses innombrables trucs et astuces de biologie moléculaire et à Virginie pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

En tout cas, bravo à tous pour avoir réussi à me supporter, je ne sais pas si j'en aurai été capable.

Merci à Steven Ball et David Dauvillee pour les photographies qui illustrent ce manuscrit et à Valérie Chopin, François Colin, Jean-Philippe Ral et Jean-Pierre Lecigne pour leur participation à ce travail lors de leur stage au laboratoire.

Je tiens à remercier Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat, avec qui j'ai eu l'honneur et le plaisir de collaborer. Je la remercie, ainsi que les membres de son groupe, pour m'avoir accueilli avec gentillesse durant deux semaines, ainsi que pour leur aide et leurs conseils qui m'ont été très profitables.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire de Chimie Biologique qui m'ont aidé et soutenu dans ce travail, leur nombre m'empêche de les citer, ils se reconnaîtront.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	7
A. L'ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF	7
1. LA MEMBRANE INTERNE	7
a) Les phospholipides	9
b) Les protéines de la membrane interne	9
(1) Exportation des protéines	11
(2) Transduction des signaux	12
2. LA MEMBRANE EXTERNE	13
a) Les phospholipides	14
b) Le LPS	14
c) Les protéines de la membrane externe	15
3. LE PERIPLASME	17
a) Le peptidoglycane	17
b) Les OPG	18
c) Les protéines	18
4. LES STRUCTURES ANNEXES DE L'ENVELOPPE	19
a) L'antigène commun	19
b) La capsule	20
c) Le flagelle	21
d) Les pilis	21
B. LES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES	22
1. DECOUVERTE	22
2. LES OPG : DES CONSTITUANTS UBIQUISTES DE L'ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF	22
a) Les OPG linéaires branchés	22
b) Les OPG cycliques α - β	24
c) Les OPG cycliques tout β	24
d) Les OPG cycliques complexes	25
3. BIOSYNTHESE DU SQUELETTE	26
a) Biosynthèse du squelette des OPG linéaires branchés	26
(1) Biosynthèse chez <i>Escherichia coli</i>	26
(2) Biosynthèse chez <i>Pseudomonas syringae</i>	29

b) Biosynthèse du squelette des OPG chez les Rhizobiacées	29
(1) Les protéines ChvA et NdvA	30
(2) Les protéines NdvB et ChvB	31
4. SUBSTITUTION	31
a) Substitution par le phosphoglycérol	31
b) Substitution par la phosphoéthanolamine	32
c) Substitution par le succinate	32
d) Substitution chez les Rhizobiacées	32
5. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE	33
a) Régulation osmotique	33
b) Surexpression des gènes de biosynthèse	34
c) Rétrocontrôle	35
d) Régulation en fonction de la phase de croissance	35
e) Régulation chez les Rhizobiacées	35
6. LES FONCTIONS DES OPG	36
a) Implication des OPG dans le renouvellement des phospholipides membranaires	36
b) Implication des OPG dans l'adaptation à l'osmolarité	38
c) Implication des OPG dans les relations bactéries-hôtes	39
d) Implication des OPG dans l'intégrité de l'enveloppe	41
e) Les OPG en tant que molécule signal	43
C. E. CHRYSANTHEMI, BACTERIE MODELE POUR L'ETUDE DES OPG	44
1. LA PECTINOLYSE	44
a) Les enzymes impliquées	44
b) Les facteurs influençant la production de pectinases	45
c) Maturation et sécrétion des pectinases	47
d) Les systèmes de régulation	49
(1) Régulation par KdgR	49
(2) Régulation par PecS/PecM	49
(3) Régulation par PecT	50
(4) Régulation par CRP	50
(5) Autres systèmes de régulation	52
2. LA CELLULOLYSE	52
3. LES PROTEASES	53
4. L'ASSIMILATION DU FER	53
5. AUTRES INTERVENANTS POSSIBLES DANS LE POUVOIR PATHOGENE	54
D. OBJECTIFS	55

A. SOUCHES ET MILIEUX	57
1. GENOTYPE DES SOUCHES UTILISEES	57
2. MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES	57
3. PLASMIDES UTILISES	58
B. TECHNIQUES GENETIQUES	58
1. TRANSDUCTION	58
2. CONJUGAISON	62
a) Isolement de R-prime	62
b) Cartographie par conjugaison	62
3. TRANSFORMATION	62
4. MUTAGENESE PAR LA N'-METHYL-N'-NITROSO-N-NITROSOGUANIDINE	62
5. RECOMBINAISON SUR LE CHROMOSOME	63
C. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	63
1. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN	63
2. ENZYMES DE RESTRICTION ET DE MODIFICATION	63
3. ELECTROPHORESE	64
4. DELETIONS PAR L'EXONUCLEASE III	64
5. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE	65
6. HYBRIDATION MOLECULAIRE	65
D. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	66
1. DOSAGE DU MDO	66
2. EXTRACTION RAPIDE DES OPG A L'ETHANOL	67
3. PURIFICATION DES OPG	67
4. DETECTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	67
5. DOSAGE DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASE ET β -GLUCURONIDASE	68
a) Dosage sur des extraits cellulaires	68
b) Dosage sur des cellules perméabilisées	69
6. DOSAGE DE L'ACTIVITE PECTATE-LYASE	69
7. DOSAGE DES PROTEINES	69
E. TESTS DE VIRULENCE	69

A. CLONAGE MOLECULAIRE DES GENES DE BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ <i>ERWINIA CHRYSANTHEMI</i>	70
---	-----------

1. COMPLEMENTATION DE LA MUTATION <i>MDOH200::Tn10</i> A L'AIDE D'UN PLASMIDE CONJUGATIF	70
2. CLONAGE DANS UN PLASMIDE A COPIES MULTIPLES	72
a) Sous-clonage à partir du R-prime	72
b) Clonage de l'extrémité 5'	73
c) Reconstitution de l'opéron en entier	74
B. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE ET CARACTERISATION DES PRODUITS DE <i>OPGGH</i>	74
1. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE	74
2. <i>OPGG</i> : UNE PROTEINE PERIPLASMIQUE HOMOLOGUE A <i>MDOG</i>	74
a) Détermination du codon d'initiation	74
b) Localisation du produit de <i>opgG</i>	83
c) La protéine <i>OpgG</i>	85
d) Similitude de séquence avec <i>MdoG</i> et <i>Orf1</i> de <i>hrpM</i>	85
3. <i>OPGH</i> : UNE PROTEINE HOMOLOGUE A <i>MDOH</i>	85
a) La protéine <i>OpgH</i>	85
b) Similitude de séquence avec <i>MdoH</i> et <i>HrpM</i>	89
4. L'OPERON <i>OPGGH</i>	89
a) Initiation de la transcription	89
b) Terminaison de la transcription	94
c) Usage des codons	94
d) Organisation de la région amont de <i>opgGH</i>	96
e) Comparaison avec <i>mdoGH</i> et <i>hrpM</i>	96
C. CONSTRUCTION DE MUTANTS PAR GENETIQUE INVERSE	102
1. INSERTION DE LA CASSETTE <i>UIDA-KAN^R</i>	102
2. IMPACT DES MUTATIONS <i>OPGG::UIDA</i> ET <i>OPGH::UIDA</i> SUR LA SYNTHÈSE D' <i>OPG</i>	102
3. CARTOGRAPHIE GENETIQUE DE <i>OPGGH</i>	102
4. EXPRESSION DES FUSIONS <i>OPGG::UIDA</i> ET <i>OPGH::UIDA</i>	104
D. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MUTANTS <i>OPG</i> D'<i>E. CHRYSANTHEMI</i>	104
1. CROISSANCE	104
2. HYPERSENSIBILITE AUX SELS BILIAIRES	105
3. HYPERPRODUCTION D'EPS	105
4. MOTILITE	105
5. PRODUCTION DES EXOENZYMES	109
a) Excrétion des pectate-lyases	109
b) Excrétion des cellulases	109

c) Excrétion des protéases	112
d) Expression des gènes <i>pel</i> et <i>out</i>	112
6. VIRULENCE	112
a) Impact des mutations <i>opg</i> sur la virulence d' <i>E. chrysanthemi</i>	112
b) Coinfection de tubercules de pomme de terre	114
c) Impact de la carence en fer sur la croissance des mutants <i>opg</i>	114
d) Croissance des mutants <i>opg</i> en présence d'extraits de tubercules de pomme de terre	118
E. RECHERCHE DE MUTANTS DE REGULATION CHEZ <i>E. COLI</i>	118
1. ETUDE DE LA REGULATION OSMOTIQUE DE L'OPERON <i>MDOGH</i> A L'AIDE DE FUSIONS TRANSCRIPTIONNELLES	118
a) Construction de fusions transcriptionnelles	118
b) Report sur le chromosome	120
c) Expression des fusions <i>mdoG::uidA</i> et <i>mdoH::uidA</i>	120
2. CONSTRUCTION D'UNE FUSION TRADUCTIONNELLE	122
3. RECHERCHE DE MUTANTS SUREXPRIMANT LA FUSION <i>MDOH'LACZ</i>	123
a) Mutagenèse par la nitrosoguanidine	123
b) Caractérisation des mutants	123
(1) Liaison au locus <i>mdoA</i>	123
(2) Synthèse d'OPG	124
(3) Activité β -galactosidase de la fusion <i>mdoH215::lacZ</i>	124
(4) Impact de la mutation <i>R2</i> sur l'expression de <i>mdoG215::uidA</i>	124
4. CARTOGRAPHIE DE LA MUTATION <i>R2</i>	127
a) Cartographie par conjugaison	127
b) Cartographie par transduction	127
IV. DISCUSSION	132
<hr/>	
A. LES LOCUS <i>MDOGH</i> D'<i>E. COLI</i> ET <i>OPGGH</i> D'<i>E. CHRYSANTHEMI</i> SONT FORTEMENT CONSERVES	133
1. <i>OPGGH</i> ET <i>MDOGH</i> SONT DES HOMOLOGUES FONCTIONNELS	133
2. L'HOMOLOGUE DE <i>MDOC</i> N'EST PAS EN AMONT DE <i>OPGGH</i>	133
3. <i>OPGGH</i> , <i>MDOGH</i> ET <i>HRPM</i> SONT FORTEMENT CONSERVES	134
B. IMPACT DES MUTATIONS OPG⁻ CHEZ <i>E. CHRYSANTHEMI</i>	135
C. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ <i>E. COLI</i>	138
D. PERSPECTIVES	144
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
<hr/>	

I. INTRODUCTION

Comme toutes les cellules, c'est d'abord à leur surface que les bactéries perçoivent les caractéristiques du milieu. L'enveloppe bactérienne joue donc un rôle prépondérant dans l'adaptation des bactéries à leur environnement, que ce soit dans la perception des variations de l'environnement, dans la transmission des signaux traduisant ces variations, et dans la réponse adaptative à ces variations.

Pour survivre, les bactéries doivent posséder différents « programmes » adaptatifs destinés à optimiser la croissance et la survie dans chacune des niches écologiques qu'elles rencontrent. Ainsi, par exemple, les régulations génétiques en fonction de l'osmolarité, de la température, de l'aérobiose et de la phase de croissance sont-elles souvent intimement liées car ces paramètres changent de manière coordonnée lors de la transition entre les milieux dilués et l'interaction avec l'hôte.

Chez les bactéries, de nombreux systèmes sont déclenchés par des variations de l'osmolarité du milieu de croissance. En particulier, la synthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés, ou OPG, est augmentée à basse osmolarité. Ces composants de l'enveloppe, universellement présents chez les bactéries à Gram négatif, sont l'objet de cette étude.

A. L'ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes, la membrane cytoplasmique (ou membrane interne) et la membrane externe, qui délimitent un compartiment caractéristique des bactéries à Gram négatif, le périplasme (Figure 1 page 8). Dans ce chapitre, la plupart des données proviennent d'études réalisées chez *Escherichia coli*.

1. LA MEMBRANE INTERNE

La membrane interne constitue la véritable frontière entre le cytoplasme et l'environnement. Elle est similaire aux membranes de cellules eucaryotes, mais contient un éventail de protéines plus étendu puisqu'elle recèle la plupart des fonctions dispersées parmi les membranes des organites eucaryotes. Ainsi, on estime que la membrane interne est composée approximativement de masses équivalentes de protéines et de phospholipides.

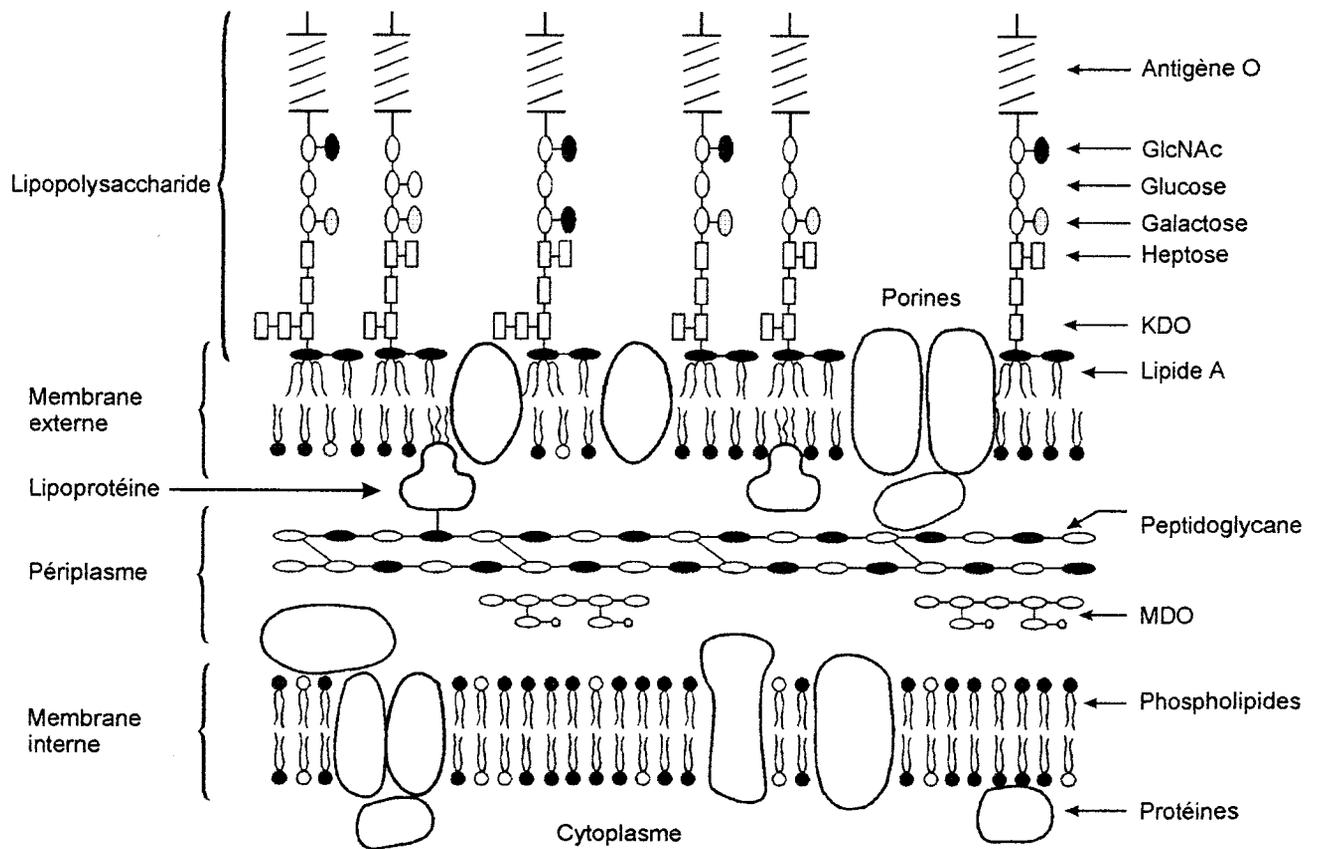


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe d'*E. coli*. KDO: acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique ; MDO: membrane derived oligosaccharides. (d'après Raetz, 1986).

a) Les phospholipides

La bicouche lipidique de la membrane interne forme une barrière hydrophobe, empêchant le libre passage des molécules polaires et permettant l'accumulation et la rétention de métabolites et de protéines. Ces lipides fournissent également un environnement favorable au fonctionnement des complexes protéiques membranaires et influencent la topologie, les interactions et le fonctionnement des protéines membranaires.

Les 3 espèces majeures de phospholipides sont la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le cardiolipide, la phosphatidyléthanolamine représentant environ 50% des phospholipides présents dans la membrane interne (Cronan et rock, 1987). Les proportions relatives de ces 3 espèces varient en fonction des souches et de l'état physiologique des cellules (Vanden Boom et Cronan, 1989). Les phospholipides ne fournissent pas seulement la matrice de la membrane, mais sont également impliqués dans la synthèse de différents types de molécules de surface. Ainsi, le renouvellement de la phosphatidyléthanolamine est-il couplé au transfert de la phosphoéthanolamine sur le MDO (membrane-derived oligosaccharides) et sur le coeur du lipopolysaccharide (Miller et Kennedy, 1987 ; Hasin et Kennedy, 1982) et celui du phosphatidylglycérol au transfert du phosphoglycérol sur la lipoprotéine de Braun et sur le MDO (Schulman et Kennedy, 1977 ; Asai et coll., 1989).

b) Les protéines de la membrane interne

La membrane interne arbore une variété et un nombre de fonctions considérables, incluant la production d'énergie, le transport de nutriments et de métabolites, la translocation des macromolécules de l'enveloppe et la transduction des signaux environnementaux. La base du flagelle et les protéines du moteur sont également ancrées dans la membrane interne. D'autre part, des protéines de la membrane interne interviennent dans les processus de réplication et de ségrégation des chromosomes (Chakraborti et coll., 1992 ; Okada et coll., 1994). Enfin, la membrane est le siège de nombreuses synthèses, comme celle du LPS, du peptidoglycane, des phospholipides, des exopolysaccharides et des OPG.

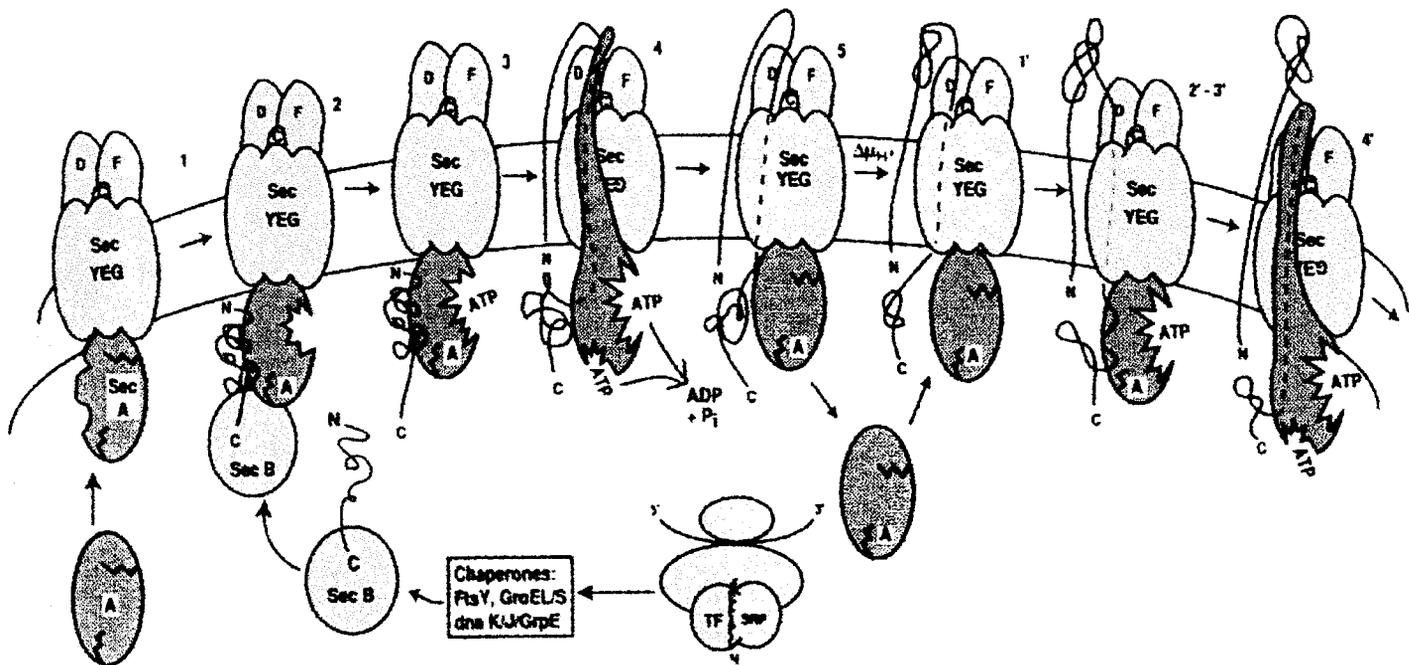


Figure 2 : Cycle catalytique du complexe préprotéine translocase, d'après Duong et coll., 1997 (voir texte).

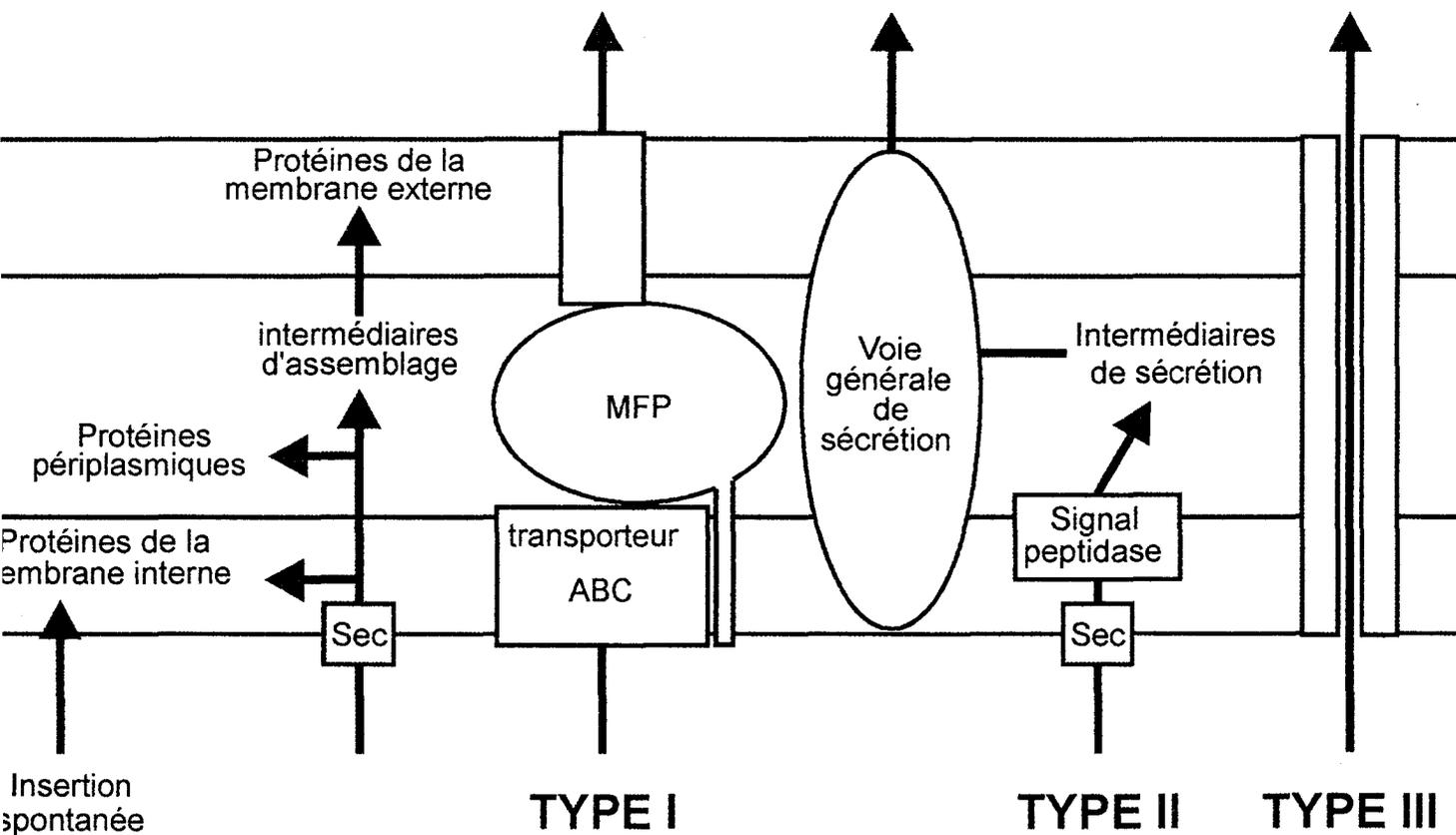


Figure 3 : Les différentes voies de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif.

(1) Exportation des protéines

Le complexe ribonucléoprotéique SRP (signal recognition particle) est nécessaire au ciblage et à l'insertion de certaines protéines de la membrane interne en particulier MdoH, glucosyl-transférase intervenant dans la biosynthèse des OPG (Ulbrandt et coll., 1997 ; Valent et coll., 1997).

Le complexe préprotéine translocase est utilisé pour la translocation, à travers la membrane interne, des protéines périplasmiques, des protéines de la membrane externe ainsi que des protéines de la membrane interne possédant un grand domaine périplasmique (Andersson et von Heijne, 1993). Ce complexe consiste en un dimère de SecA lié à un complexe membranaire formé de SecY, SecE, SecG, SecD, SecF et YajC (Duong et coll., 1997). SecA est activé de part sa liaison à SecYE et est alors capable de fixer le complexe préprotéine-SecB (protéine tétramérique chaperon des protéines dédiées à l'export), qui est ainsi guidé vers la translocase. La fixation de la préprotéine active SecA pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. La liaison de l'ATP entraîne un changement de conformation de SecA, qui s'insère à travers le complexe SecYEGDFYajC en emportant la partie amino-terminale de la préprotéine. SecA hydrolyse alors l'ATP, libère la préprotéine et se déinsère. Le reste de la préprotéine peut alors s'écouler à travers la translocase en utilisant la force proton-motrice comme source d'énergie. SecA peut également se réengager avec une autre partie de la préprotéine.

Les bactéries à Gram négatif utilisent 3 voies principales pour la sécrétion des protéines (Figure 3 page 10 ; Pugsley, 1993 ; Wandersman, 1996). Les protéines utilisant le système de type I, comme l'hémolysine d'*E. coli* ou les protéases d'*Erwinia chrysanthemi*, sont sécrétées en une seule étape médiée par un complexe de 3 protéines : un transporteur de type ABC (ATP binding cassette), une protéine de la membrane interne MFP (membrane fusion protein), et une protéine de la membrane externe. Les protéines utilisant la voie de sécrétion de type II, comme la pullulanase de *Klebsiella oxytoca* ou les pectate-lyases d'*E. chrysanthemi*, traversent la membrane interne *via* le système Sec, et la membrane externe par un système auxiliaire composé de 13 à 15 protéines. Enfin, le système de sécrétion de type III est un complexe protéique dédié à l'exportation de protéines de virulence de bactéries pathogènes de plantes ou d'animaux, telles que les protéines Yops de *Yersinia*, Ipas de *Shigella*, ou les protéines harpin-like de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* et *Ralstonia solanacearum* (Van Gijsegem et coll., 1993).

(2) Transduction des signaux

La membrane interne comporte de nombreuses protéines régulatrices responsables de la transduction de signaux en réponse à des variations de l'environnement et des protéines spécifiques du chimiotactisme (Ninfa, 1996). Les bactéries sont capables de répondre à quatre types de stimulus environnementaux : les paramètres physico-chimiques et la présence d'agents délétères, la disponibilité en nutriment, la présence de cellules de même type et leur localisation dans une niche particulière comme l'hôte. Si de nombreux stimulus sont perçus par des composants cytoplasmiques, certaines caractéristiques de l'environnement (présence de glucose extracellulaire, pH, osmolarité, disponibilité en phosphate inorganique, présence de cellules hôtes, molécules attractives...) sont perçues à la surface de la cellule.

Dans la plupart des cas, la transduction du signal est réalisée par un couple capteur-régulateur, dont on estime le nombre à plus de 50 chez *E. coli* (Stock et coll., 1989). Typiquement, une protéine membranaire capteur, ou HK (histidine kinase) s'autophosphoryle sur une histidine conservée en réponse à un signal spécifique. Le transfert du groupement phosphate sur un aspartate conservé de l'élément RR (response regulator) dote ce dernier de la capacité fonctionnelle de régulateur transcriptionnel. Certaines HK possèdent également une activité RR-P phosphatase, permettant à l'élément RR de demeurer inactif en absence de signal et de tenir compte de l'évolution du signal au cours du temps. Dans certains cas, une aspartyl-phosphatase distincte de la HK peut également agir directement sur l'élément RR pour contrôler le fonctionnement du système, généralement en diminuant l'activité de l'élément RR (Hoch et Silhavy, 1995 ; Perego et coll., 1996 ; Ninfa, 1996).

Le couple capteur-régulateur le plus étudié est le couple EnvZ-OmpR, qui régulent l'expression des porines OmpC et OmpF, dont l'abondance relative est régulée par l'osmolarité. A basse osmolarité OmpF est la porine majoritaire alors que l'inverse se produit à haute osmolarité (Csonka, 1989), la régulation s'effectuant essentiellement au niveau transcriptionnel (Mizuno et Mizushima, 1990 ; Pratt et coll., 1996). EnvZ est le capteur transmembranaire qui perçoit les variations d'osmolarité du milieu et qui régule le taux de la forme phosphorylée de OmpR en fonction de l'osmolarité du milieu, cette forme de OmpR activant la transcription de *ompC* et de *ompF*. A basse osmolarité, OmpR active préférentiellement la transcription de *ompF* dont les séquences régulatrices ont la plus forte affinité pour OmpR. A haute osmolarité, OmpR active la transcription de *ompC* et réprime celle de *ompF*. Cette répression s'effectue par formation d'une boucle via des interactions entre les molécules de OmpR ce qui « verrouille » le promoteur soit en diminuant son accessibilité soit plus vraisemblablement en stabilisant le complexe fermé ARN-polymérase-

promoteur (Tsong et coll., 1990 ; Slauch et Silhavy, 1991). La régulation de l'expression est fortement dépendante de la conformation de l'ADN au voisinage du promoteur. D'ailleurs, l'expression des porines est influencée par des mutations dans *osmZ* (codant H-NS) et les facteurs influençant la synthèse des porines sont connus pour modifier le degré de surenroulement de l'ADN.

D'autres couples capteur-régulateur sont impliqués dans des régulations osmotiques, bien que ce système de régulation ne soit pas le seul utilisé (Csonka, 1989 ; Csonka et Epstein, 1996). Les bactéries, pour survivre, doivent maintenir une pression osmotique interne supérieure à celle du milieu extérieur, cette pression de turgescence étant indispensable à la croissance et à la division cellulaire. La première réponse de la cellule à un choc hyperosmotique est l'entrée transitoire d'ions potassium. Toutefois, une augmentation excessive de la force ionique intracellulaire inhibe l'activité de certaines enzymes. Ainsi, la réponse secondaire de la cellule est-elle l'accumulation de solutés dits compatibles en remplacement des ions potassium. Ces composés ont la propriété de pouvoir être accumulés en grande quantité sans bouleverser le métabolisme cellulaire. Le nombre de ces osmoprotecteurs est assez réduit, ce sont des polyols, des sucres, des acides aminés et des dérivés d'acides aminés. L'accumulation des osmoprotecteurs est réalisée, selon les cas, par modulation de leur biosynthèse, de leur catabolisme, de leur transport ou de leur efflux. Les systèmes de régulation impliquent, selon les cas, des couples capteur-régulateur, le surenroulement de l'ADN, la composition ionique intracellulaire (en particulier la concentration en glutamate de potassium) ou la modulation des activités enzymatiques.

Outre la synthèse des OPG qui est l'objet du présent travail, il existe peu de systèmes connus induits à basse osmolarité. On ne sait pas s'il en existe autant qu'à haute osmolarité mais le faible nombre d'études portant sur les effets d'une faible osmolarité est peut-être à l'origine de cette méconnaissance. On peut citer l'accumulation de putrescine (Munro et coll., 1972) et la synthèse d'AqpZ, aquaporine participant à la réponse adaptative aux conditions de basse osmolarité (Calamita et coll., 1998). Cependant, les mécanismes de la régulation osmotique de ces systèmes restent à ce jour totalement inconnus.

2. LA MEMBRANE EXTERNE

La membrane externe, de part sa structure particulière, est très rigide ; elle empêche à la fois le passage de molécules hydrophiles et le passage de molécules hydrophobes. En effet, les molécules de LPS, fortement chargées négativement, interagissent entre elles via des ponts

phosphate-ions bivalents (Ca^{++} et Mg^{++}) et ces interactions représentent une barrière efficace contre la pénétration de molécules hydrophobes. Ces interactions permettent également de stabiliser l'asymétrie de la membrane externe. Le LPS possède une proportion d'acides gras saturés beaucoup plus importante que les autres lipides, ce qui rend la membrane externe plus rigide qu'une autre membrane.

a) Les phospholipides

La membrane externe diffère considérablement de la membrane interne par une totale asymétrie de sa bicouche lipidique. La couche externe est uniquement constituée de LPS, alors que la couche interne est quant à elle presque exclusivement composée de phosphatidyléthanolamine.

b) Le LPS

Le LPS (lipopolysaccharide) est constitué de 3 parties : la plus proximale, hydrophobe, le lipide A ; la plus distale, hydrophile, saillante, l'antigène O ; et le coeur joignant les 2 premières.

Le lipide A est un lipide polaire de structure particulière, dans laquelle un squelette de 2 N-acétylglucosamines liées entre elles par une liaison β -1,6 et substitué par 6 ou 7 acides gras (différents de ceux des phospholipides).

Le coeur contient 2 sucres spécifiques du LPS, le KDO (acide 3-désoxy-D-manoctulosonique) et un heptose (le L-glycéro-D-mannoheptose) ainsi que divers sucres plus communs (glucose, galactose, N-acétyl-D-glucosamine). La partie proximale du coeur et le squelette du lipide A sont substitués par un grand nombre de groupements chargés, la plupart anioniques, en particulier une phosphoéthanolamine et une pyrophosphoéthanolamine provenant des phosphatidyléthanolamines (Hasin et Kennedy, 1982 ; Miller et Kennedy, 1987).

L'antigène O, lorsqu'il est présent, est constitué de 1 à 40 répétitions d'un motif oligosaccharidique de 3 à 5 sucres. La structure de l'antigène O varie énormément chez les bactéries à Gram négatif. Par exemple, au moins 160 arrangements chimiques différents ont été recensés chez *E. coli*.

Les particularités phénotypiques de mutants synthétisant des LPS incomplets ont permis d'élucider les fonctions biologiques de ses différentes parties (Nikaido, 1996).

L'absence de l'antigène O résulte en une perte de virulence chez *E. coli*, suggérant qu'il intervient pour contrecarrer les défenses de l'hôte, en particulier la phagocytose.

La perte de la partie proximale du core chez les mutants « deep rough » rend ceux-ci exceptionnellement sensibles à une large gamme de composés hydrophobes tels que antibiotiques, sels biliaires et détergents (Vaara, 1993). En effet, l'altération du LPS entraîne une diminution de la quantité de protéines présentes dans la membrane externe, corrélée à une incorporation accrue de phospholipides, y compris dans la couche externe (Nikaido et Vaara, 1985). Le coeur est donc vraisemblablement impliqué dans les fonctions de barrière du LPS. En fait, la membrane externe ne fait que ralentir la diffusion des molécules hydrophobes, ce qui explique que les bactéries à Gram négatif requièrent des mécanismes additionnels, en particulier un efflux actif, pour résister efficacement contre les inhibiteurs hydrophobes.

Très peu de données sont actuellement disponibles concernant le rôle du LPS dans les relations bactéries-plantes. Il est toutefois évident que toute altération de ces composés peut entraîner une modification importante de la composition, de la structure et de l'intégrité de la membrane externe, et donc affecter ces relations. Par exemple, Kingsley et coll. (1993) ont montré qu'un mutant de *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* qui synthétise un LPS altéré et 75% moins d'EPS qu'une souche sauvage, meurt moins de 5 jours après l'inoculation de 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. L'altération ou la perte de l'antigène O réduisent également la virulence chez des bactéries phytopathogènes telles que *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Smith et coll., 1994) et des mutants de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* dépourvu d'antigène O forment des nodules vides de bactéroïdes, car les bactéries ne sont pas relâchées depuis le cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules méristématiques de la plante et sont tuées dans le cordon d'infection (De Maagd et coll., 1989).

c) Les protéines de la membrane externe

La membrane externe comporte d'une part un petit nombre de protéines fortement représentées, des protéines de structure qui participent au maintien de l'intégrité de l'enveloppe et des porines, d'autre part des protéines participant à des transports spécifiques.

La lipoprotéine de Braun est une petite protéine (7200 Da) fortement représentée ($7 \cdot 10^5$ copies par cellule). La cystéine amino-terminale est substituée par un diglycéride et un acide gras permettant l'ancrage dans la couche interne de la membrane externe. Environ un tiers de ces molécules sont liées de manière covalente au peptidoglycane.

OmpA participe également au maintien de l'intégrité de l'enveloppe, et des mutants *ompA* tendent à se présenter sous forme de cellules sphériques à membrane externe instable (Nikaido et Vaara, 1985). Des protéines OmpA purifiées produisent des canaux de la même taille que ceux formés par OmpF mais la diffusion de solutés est beaucoup plus lente et OmpA ne doit donc pas intervenir de manière significative dans la perméabilité de la membrane externe (Sugawara et Nikaido, 1992 ; Saint et coll., 1993).

Il existe également dans la membrane externe des protéines formant des canaux spécifiques, tel que LamB pour le transport du maltose et des maltodextrines et Tsx pour l'entrée des nucléosides.

Les protéines OmpC, OmpF et PhoE s'organisent en trimères formant des canaux permettant le passage par diffusion simple non spécifique de petites molécules hydrophiles. PhoE est produite en conditions de carence en phosphate. OmpC forme des pores légèrement plus petits que ceux constitués par OmpF et est synthétisée préférentiellement à haute osmolarité et à haute température. L'abondance relative de ces 2 porines est régulée par de nombreux autres signaux environnementaux : l'osmolarité, le pH, l'anaérobiose, mais aussi le stress oxydatif, la réponse des phagocytes de l'hôte à une invasion (Chou et coll., 1993) ou le salicylate, produit par les tissus végétaux en réponse à une invasion (Sawai et coll., 1987).

Des récepteurs de haute affinité, tels que BtuB (récepteur de la vitamine B12) ou FepA (récepteur de l'entérobactine), catalysent un transport spécifique à travers la membrane externe dans lequel est impliqué TonB, une protéine ancrée dans la membrane interne (Postle, 1993). Ces transports (au moins dans le cas de la vitamine B12) permettent l'accumulation du ligand dans le périplasme jusqu'à 1000 fois par rapport au milieu externe en utilisant la force proton-motrice comme source d'énergie (Bradbeer, 1993). Ce type de transport est utilisé pour des molécules trop grandes pour traverser les canaux des porines et/ou dont la concentration est extrêmement faible.

Enfin, il existe des systèmes d'exportation de protéines, telles que l'hémolysine chez *E. coli* (HlyB-HlyD-TolC ; Wandersman et Delepelaire, 1990) ou les protéases B et C d'*Erwinia chrysanthemi* (PrtD-PrtE-PrtF ; Létoffé et coll., 1990), et des pompes d'efflux comme par exemple AcrA-AcrB-TolC chez *E. coli* (Nikaido, 1996), système de large spécificité pouvant transporter de nombreux antibiotiques hydrophobes, détergents et autres

composés hydrophobes (novobiocine, mitomycine C, tétracycline, érythromycine, SDS, acridine...). Tous ces systèmes traversent à la fois la membrane interne et la membrane externe par un système à 3 composants. La protéine transporteur (AcrB, HlyB, PtrD) est localisée dans la membrane interne, et une protéine accessoire de type MFP (AcrA, HlyD, PrtE) fait le lien avec le canal de la membrane externe (TolC, PrtF). Si les transporteurs HlyB et PrtD appartiennent à la famille des protéines ABC (ATP-binding cassette), les pompes d'efflux utilisent la force proton-motrice comme source d'énergie.

Chez *E. coli*, il existe un autre type de pompe d'efflux, EmrAB dont la protéine transporteur EmrB, ne possède pas le grand domaine périplasmique caractéristique des systèmes du premier groupe. Ces systèmes sont actifs sur une très large gamme de composés et seraient capables de les transporter également à partir du périplasma. Il existe chez *E. coli* d'autres pompes d'efflux non caractérisées, notamment pour le transport des sels biliaires (Thanassi et coll., 1997). Il existe d'ailleurs des homologues de AcrAB : AcrEF, YhiUV et AcrD (Ma et coll., 1994).

TolC pourrait, sous forme d'oligomères, former des pores au sein de la membrane externe (Benz et coll., 1993). Des mutants *tolC*, bien que présentant un LPS altéré (Schnaitman et Klena, 1993) présentent un phénotype « deep rough » attribué à un défaut d'efflux actif (Fralick et Burns-Keliher, 1994). Ainsi, TolC ferait partie intégrante du système de pompe d'efflux AcrAB, et pourrait participer à d'autres systèmes d'efflux actifs (Fralick, 1996).

3. LE PERIPLASME

a) Le peptidoglycane

Le peptidoglycane d'*E. coli* est constitué d'un motif disaccharidique N-acétylglucosamine- β -1,4-acide N-acétylmuramique répété environ 30 fois (Park, 1996). Chaque acide N-acétylmuramique est substitué sur sa fonction carboxylique par une liaison amide, par un térapeptide L-alanyl-D-isoglutamyl-L-*meso*-diaminopimétyl-D-alanine. La moitié environ des chaînes sont reliées entre elles par l'intermédiaire de la chaîne peptidique, dans 80% des cas, par une liaison entre le groupe carboxylique de la D-alanine et la fonction amine libre de l'acide *meso*-diaminopimélique d'une chaîne adjacente ; dans 20% des cas par une liaison entre 2 acides *meso*-diaminopiméliques. Ces liaisons permettent au peptidoglycane de former un réseau. Bien que la composition chimique du peptidoglycane puisse varier selon les espèces, l'architecture générale est conservée chez les bactéries à Gram

· négatif. Les chaînes, serpentines, seraient arrangées perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule. L'architecture aux pôles n'est pas connue, mais consiste vraisemblablement en une superposition d'anneaux de peptidoglycane de taille de plus en plus réduite. Le peptidoglycane est relié à la membrane externe, environ tous les 10 muropeptides, par l'intermédiaire de la lipoprotéine, liée de manière covalente avec l'acide *meso*-diaminopimélique. Cette interaction est renforcée par l'association forte du peptidoglycane avec les porines.

L'élongation et la septation, durant lesquels le peptidoglycane conserve sa forme et son intégrité, sont des processus distincts. Ainsi par exemple les mutants *fts* (temperature-sensitive filament former) sont-ils spécifiquement atteints dans la septation (Donachie et coll., 1984). Un grand nombre de protéines sont impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane. En effet, en plus des enzymes de biosynthèse, il existe de nombreuses enzymes hydrolytiques impliquées dans le renouvellement, l'élongation et la septation. Enfin, du fait que le peptidoglycane forme un filet dont les mailles ne laissent passer que des protéines de taille inférieures à 50 Kda, il a été proposé que la mise en place de structures traversant le périplasme, telles que le flagelle, les pilis, et les systèmes de sécrétion, nécessite un réarrangement local du peptidoglycane faisant intervenir des enzymes spécifiques à chaque système (Dijkstra et Keck, 1996).

b) Les OPG

Les OPG (osmoregulated periplasmic glucans) sont décrits dans le paragraphe B page 22.

c) Les protéines

La plupart des protéines périplasmiques peuvent être classées en un petit nombre de groupes fonctionnels (Oliver, 1996).

Des protéines affines, qui fonctionnent en conjonction avec des transporteurs de type ABC et/ou des récepteurs du chimiotactisme, pour la détection et le transport de sucres, acides aminés, peptides, vitamines et ions.

Des enzymes cataboliques, qui hydrolysent des molécules complexes en précurseurs utilisables par la cellule (phosphatases, protéases, nucléases) et des protéines qui interviennent dans la biosynthèse et le renouvellement du peptidoglycane.

Des protéines de détoxification (comme par exemple la β -lactamase), qui inactivent les composés toxiques ayant traversé la membrane externe.

Des protéines qui interviennent dans la biogenèse de l'enveloppe et de ses structures annexes. D'une part, les protéines catalysant la formation des ponts disulfures (DsbA, DsbC), intervenant dans la mise en conformation des protéines (les peptidyl-prolyl-isomérases RotA, FkpA et SurA) et les protéines chaperons (PapD, spécifique des pilis ; p20, intervenant dans la translocation de la lipoprotéine vers la membrane externe). D'autre part, des protéines intervenant dans la biosynthèse de l'exopolysaccharide (KpsD), des OPG (MdoG), voire du LPS (pour son exportation vers la membrane externe).

Le système Tol est un complexe multiprotéique composé de trois protéines de la membrane interne (TolA, TolQ et TolR), deux protéines périplasmiques (TolB et Orf2) et PAL (peptidoglycan-associated lipoprotein), lipoprotéine de la membrane externe. Les protéines Tol forment vraisemblablement un complexe stoechiométrique principalement localisé aux sites de jonction des membranes interne et externe (Guihard et coll., 1993). Le rôle physiologique de ce complexe est inconnu, mais il semble important au maintien de l'intégrité de l'enveloppe puisque les mutants *tol* et *pal* se caractérisent par une hypersensibilité aux composés hydrophobes et aux détergents et par une perte de protéines périplasmiques dans le milieu extracellulaire (Fognini-Lefebvre et coll., 1987). En fait, le système Tol pourrait être impliqué dans la biogenèse des trimères de porines au sein de la membrane externe (Dérrouiche et coll., 1996 ; Rigal et coll., 1997) et le phénotype pléiotrope des mutants *tol* et *pal* pourrait ainsi être une conséquence directe d'une altération de l'intégrité de la membrane externe.

4. LES STRUCTURES ANNEXES DE L'ENVELOPPE

a) L'antigène commun

L'ECA (Enterobacterial Common Antigen) est un polysaccharide acide, polymère de N-acétyl-D-glucosamine, acide N-acétyl-D-mannosaminuronique et 4-acetamido-4,6-dideoxy-D-galactose (Lugowski et coll., 1983). L'ECA existe sous 2 formes (Kuhn et coll., 1988). Dans la forme ECA_{PG}, non immunogène, le squelette est substitué par un phosphoglycéride permettant l'ancrage dans la couche externe de la membrane externe. Dans la forme ECA_{LPS}, présente chez les souches immunogènes, le squelette est lié à un coeur R1, R4, ou K-12 du LPS. L'ECA remplace alors l'antigène O (dans 5% des molécules) et serait greffé par la O-translocase ou la O-antigène-ligase. Enfin une forme cyclique, ECA_{CYC}, hydrophile, a été

décrite chez *Yersinia pestis* et *Shigella sonnei*. Le fait que l'ECA ait été détecté chez toutes les enterobacteriaceae testées (sauf *Erwinia chrysanthemi*, alors que les autres espèces d'*Erwinia* possède l'ECA ; Kuhn et coll., 1988), et soit absent chez les autres bactéries suggère que l'ECA remplisse une fonction unique, mais non identifiée, chez ces organismes.

b) La capsule

La production d'une capsule exopolysaccharidique est une caractéristique de nombreux microorganismes. Cette structure est impliquée dans la résistance face aux défenses de l'hôte ou aux environnements hostiles, la prévention de la dessiccation et la formation de microcolonies (Costerton et coll., 1987).

Chez *E. coli*, les antigènes de la série K jouent un rôle important dans la pathogénie. Par exemple, l'antigène K1 est retrouvé dans 80% des cas de méningite néonatale et dans la plupart des cas de septicémie néonatale (Bliss et Silver, 1996).

L'antigène M, ou acide colanique, est produit en faible quantité par la plupart des souches mais la synthèse est fortement augmentée dans certaines conditions, comme haute osmolarité, basse température ou concentration élevée en phosphate, entraînant une forte mucosité (Gottesman et Stout, 1991). La régulation de l'expression des gènes *cps*, qui gouvernent la polymérisation, le transport et la modification du polysaccharide (Stevenson et coll., 1996), est effectuée d'une part par un couple capteur-régulateur, RcsC/RcsB (Stout et Gottesman, 1990), d'autre part par le couple RcsA/Lon (Stout et coll., 1991). Le couple RcsC/RcsB est activé par des stimulus environnementaux comme la dessiccation (Ophir et Gutnick, 1994) et l'hyperosmolarité (Sledjeski et Gottesman, 1996). Lon est une protéase dépendant de l'ATP capable de dégrader plusieurs protéines, dont RcsA, régulateur positif de la synthèse d'acide colanique.

La présence d'exopolysaccharides (EPS) à la surface des cellules est souvent indispensable à l'établissement des relations bactérie-hôte. Par exemple, des mutants de *Sinorhizobium meliloti* ne synthétisant plus de succinoglycane (l'EPS majeur) ou défectueux dans la succinylation de celui-ci induisent chez la luzerne des nodules inefficaces dans la fixation de l'azote car vides de bactéroïdes (Leigh et coll., 1985 ; Leigh et coll., 1987). Il semble que l'EPS joue un rôle spécifique dans l'établissement de la symbiose et qu'il agisse comme une molécule signal durant ce processus (Gonzales et coll., 1996). En revanche, les EPS semblent jouer un rôle moins spécifique dans la pathogénèse, même s'il existe souvent une corrélation entre la synthèse de ces composés et la virulence (Leigh et Coplin, 1992 ;

Denny, 1995). Les EPS peuvent entraîner un flétrissement en bloquant les vaisseaux du xylème ; permettre l'attachement aux cellules végétales ; promouvoir l'invasion, la croissance et la survie au sein des tissus végétaux, en contrecarrant les défenses de la plante.

c) Le flagelle

La plupart des bactéries motiles se déplacent grâce à des flagelles. Chez *E. coli*, la succession de périodes de nage et de culbutes permet le chimiotactisme, puisque la direction générale de la nage dépend de la durée des périodes de nage et de la fréquence des culbutes. La perception des gradients est réalisée grâce à des protéines membranaires (Stock et Surette, 1996 ; Manson et coll., 1998), en particulier Tar (aspartate et maltose), Tsr (sérine) et Trg (ribose, galactose, glucose). L'information est ensuite intégrée par les protéines Che qui gouvernent la rotation du flagelle. Le flagelle est constitué de 3 parties : le filament est relié à la cellule par le crochet, structuralement proche du filament, lui-même connecté au corps basal, ancré dans l'enveloppe. Le corps basal est une structure complexe, composé d'un axe et de 4 disques. Le moteur, qui utilise la force proton-motrice comme source d'énergie, permet la rotation, dans un sens ou dans l'autre, de l'ensemble disque S-disque M-crochet-filament, les disques L et P étant fixes.

d) Les pilis

Les pilis, ou fimbriae, sont les organites de l'attachement aux surfaces (Hultgren et coll., 1993). Ils prennent naissance dans la membrane interne et s'étendent dans le milieu sur 0,2 à 2 μm de long. Ils sont composés de protéines structurales, les pilines. Certains pilis, les pilis sexuels, jouent un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne, ils forment l'attachement initial entre les partenaires qui s'accouplent. D'autres, les pilis de type 1 ou pilis communs, sont impliqués dans l'attachement des bactéries, en particulier aux cellules eucaryotes. Des protéines mineures, les adhesines, parfois situées à la pointe du pili, sont responsables des propriétés d'attachement.

B. LES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES

1. DECOUVERTE

C'est en étudiant le renouvellement des phospholipides membranaires chez *E. coli* que Van Golde et coll. (1973) ont mis en évidence un transfert de radioactivité initialement contenue dans la fraction lipidique vers une fraction de la phase aqueuse. Ces auteurs ont montré que, lors de la croissance, une partie importante du *sn*-1-phospho-glycérol, tête polaire du phosphatidylglycérol, est transféré à des oligosaccharides. De par leur relation avec le métabolisme des phospholipides membranaires, ces oligosaccharides ont été initialement dénommés membrane-derived oligosaccharides, ou MDO.

2. LES OPG : DES CONSTITUANTS UBIQUISTES DE L'ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

En fait, les oligosaccharides découverts par Kennedy sont des constituants généraux de l'enveloppe de toutes les bactéries à Gram négatif (Schulman et Kennedy, 1979). Leurs caractéristiques communes chez toutes les bactéries étudiées, c'est à dire squelette glucidique uniquement constitué de glucose, localisation périplasmique et abondance osmotiquement régulée, leur valent l'appellation d'OPG (osmoregulated periplasmic glucans).

La quantité cellulaire d'OPG varie, selon les espèces, la composition du milieu de culture, l'état physiologique des bactéries, de 0,5% à 20% du poids sec des bactéries. Les OPG peuvent être linéaires branchés ou cycliques, homogènes ou hétérogènes en taille. Si le glucose est le seul monosaccharide présent, les OPG peuvent être substitués par des molécules d'origine et de nature diverses selon les espèces. Les caractéristiques du squelette glucosidique ont permis le classement des OPG en quatre familles structurales (Talaga, 1996 ; Figure 4 page 23).

a) Les OPG linéaires branchés

Les OPG linéaires branchés sont caractéristiques des bactéries de la subdivision gamma des protéobactéries, dont le modèle d'étude est *E. coli*. Chez cette espèce, les OPG sont constitués d'un squelette de 6 à 12 résidus de glucose organisés en une chaîne linéaire formée par des liaisons β -1,2 ramifiée en β -1,6 (Schneider et coll., 1979 ; Figure 4 page 23). Ils sont substitués par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol et de phosphoéthanolamine liés par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester sur le carbone 6 de certaines unités glucosidiques (Kennedy et coll., 1976).

Proteobacteria

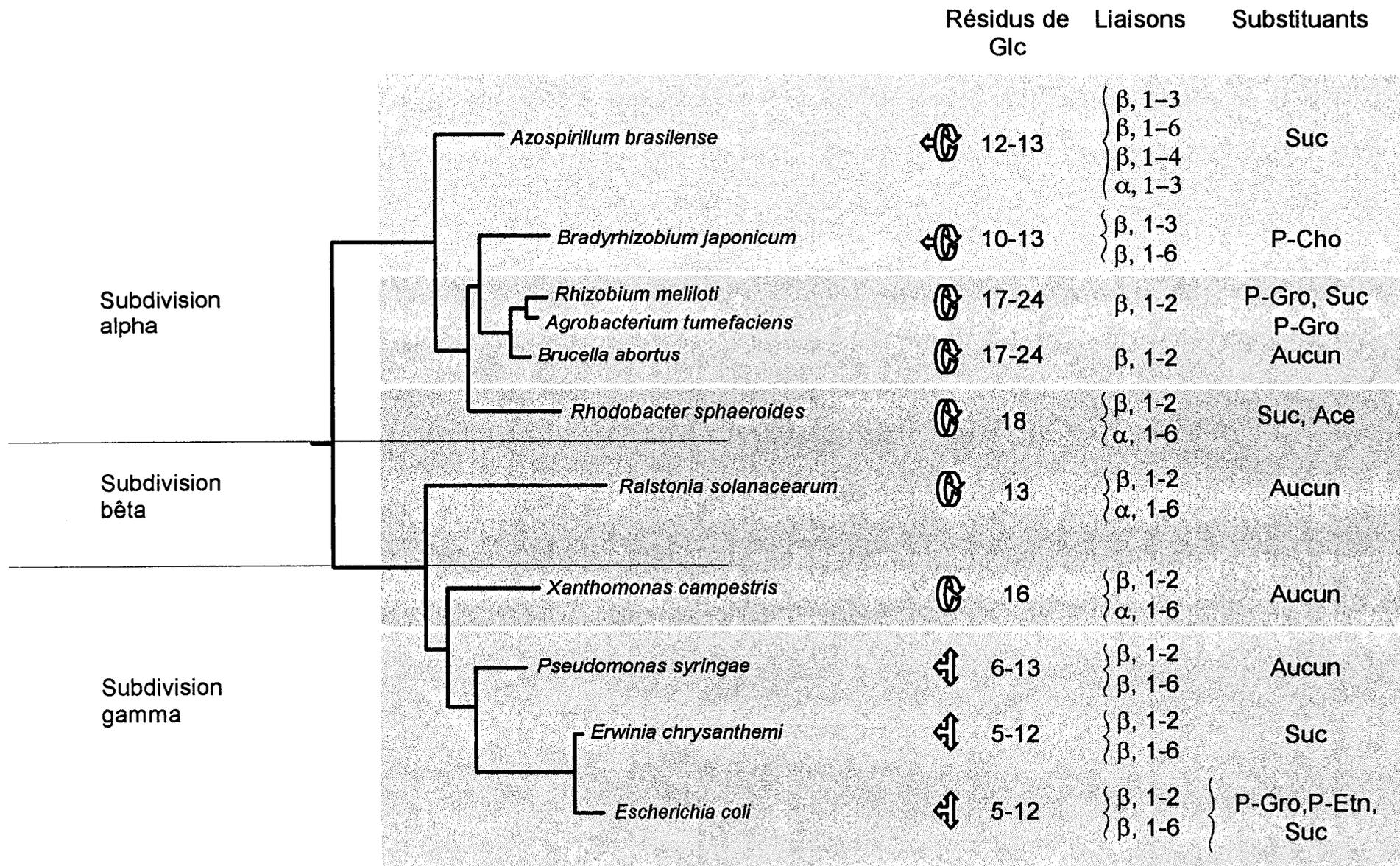


Figure 4 : Représentation de la diversité structurale des OPG en fonction de la position des bactéries qui les synthétisent dans l'arbre phylogénétique.

Ils sont également substitués par des résidus de succinate (Van Golde et coll., 1973) liés par l'intermédiaire d'une liaison ester sur un point non encore déterminé du squelette. La substitution est, comme la distribution en taille, hétérogène. Le *sn*-1-phosphoglycérol est le substituant majeur du MDO avec en moyenne trois molécules par glucane, le succinate est approximativement présent dans une forme sur deux et la phosphoéthanolamine est faiblement représentée (Talaga, 1996).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (Talaga et coll., 1994), *Klebsiella pneumoniae* (Anemura et Cabrera-Crespo, 1986) et *Erwinia chrysanthemi* (Talaga, 1996) produisent des OPG dont le squelette glucosidique est pratiquement identique à celui des OPG d'*E. coli*. Par contre, les OPG de *P. syringae* et de *K. pneumoniae* ne sont pas substitués et les OPG d'*E. chrysanthemi* ne sont substitués que par des résidus de succinate. Des OPG ont également été détectés chez *Shigella flexneri* (Loubens, 1993) et chez *Erwinia amylovora*, où l'existence de liaisons β -1,2 et β -1,6 a été démontrée (Smith et coll., 1995).

b) Les OPG cycliques α - β

Les OPG cycliques α - β (Figure 6 page 37) se caractérisent d'une part, par la présence d'une liaison α -1,6 au sein du cycle de résidus de glucose liés en β -1,2 et d'autre part, par leur homogénéité de taille au sein d'une même espèce. *Xanthomonas oryzae*, *X. phaseoli* (Amemura et Cabrera-Crespo, 1986) et *X. campestris* pv. *citri* (York, 1995 ; Talaga et coll., 1996) produisent des OPG non substitués à 16 résidus de glucose ; *Ralstonia solanacearum* des OPG non substitués à 13 résidus de glucose (Talaga et coll., 1996) et *Rhodobacter sphaeroides* des OPG à 18 résidus de glucose substitués par des résidus de succinate et d'acétate (Talaga, 1996 ; Coge, 1997).

c) Les OPG cycliques tout β

Les bactéries des genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* synthétisent des glucanes cycliques liés en β -1,2 (Figure 6 page 37 ; Breedveld et Miller, 1994). Les premières études de ces composés ont été effectuées sur les OPG présents dans le milieu de culture, occultant la localisation périplasmique de ces composés. Cependant, leur concentration cellulaire représente de 5 à 20% du poids sec, selon l'espèce, la composition du milieu de culture, et la phase de croissance (Zevenhuizen et Scholten-Koerselman, 1979 ; Abe et coll., 1982 ; Miller et coll., 1986 ; Zevenhuizen, 1986 ; Zevenhuizen et Van Neerven, 1983 ; Breedveld et coll.,

1990 ; Hisamatsu, 1992). Actuellement, on ne sait pas si les OPG présents dans le milieu de culture sont la conséquence d'une véritable excrétion ou d'une fuite due à une instabilité de l'enveloppe dans certaines conditions telles que température et osmolarité élevées et entrée en phase stationnaire (Breedveld et coll., 1990 ; Geiger et coll., 1991 ; Breedveld et coll., 1992).

Les OPG produits par *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *A. tumefaciens* sont composés d'un mélange de glucanes de 17 à 26 résidus de glucose par molécules (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 *Sinorhizobium meliloti* (Koizumi et coll., 1984 ; Benincasa et coll., 1987). *R. phaseolus* et *R. tropici* synthétisent des OPG dont l'espèce majoritaire possède 17 résidus de glucose par molécule (Hisamatsu et coll., 1983 ; Serrano et coll., 1993). Enfin, *Brucella melitensis* et *Brucella abortus* produisent des OPG contenant 17 à 24 résidus de glucose (Bundle et coll., 1988).

Les OPG cycliques liés en β -1,2 peuvent-être substitués par des résidus de *sn*-1-phosphoglycérol, de succinate (Batley et coll., 1987 ; Miller et coll., 1987 ; Miller et coll., 1988 ; Zevenhuizen, 1990) et de méthylmalonate (Hisamatsu et coll., 1987). Le substituant majeur des OPG de *S. meliloti* et *A. tumefaciens* est le phosphoglycérol (Miller et coll., 1986), lié au glucose par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester sur le carbone 6 (Batley et coll., 1987). Le taux de substitution peut grandement varier au sein des différentes espèces. Par exemple, les OPG produits par certaines souches de *R. leguminosorum* et par *Rhizobium sp.* GRH2 ne sont pas substitués (Zevenhuizen et coll., 1990 ; Lopez-Lara et coll., 1993) alors que 90% des OPG produits par *S. meliloti* et *Rhizobium sp.* NGR234 sont substitués (Batley et coll., 1987 ; Miller et coll., 1988).

d) Les OPG cycliques complexes

Bradyrhizobium japonicum produit des OPG cycliques liés en β -1,3 et β -1,6 (Figure 6 page 37) composés de 11 à 13 résidus de glucose et pouvant être substitués par de la phosphocholine (Dudman et Jones, 1980 ; Miller et coll., 1990 ; Tully et coll., 1990 ; Cohen et Miller, 1991 ; Rolin et coll., 1992 . Miller et Gore, 1992). Cependant, les proportions de liaisons β -1,3 et β -1,6 varient selon les souches et les auteurs et la structure exacte de ces composés n'est pas établie.

Azospirillum brasilense accumule dans son périplasme à basse osmolarité des glucanes liés par des liaisons β -1,3 et β 1,6 (Altabe et coll., 1994). Altabe et coll. (1998) ont montré que ces OPG existent sous trois formes distinctes : un cycle de 11 glucoses dont 3 liés en β -1,3 et 8 en β -1,6 plus un glucose lié en β -1,4 ; ce même cycle substitué par un résidu de glucose lié en α -1,3 ; cette même structure méthylée en position 2 sur le glucose en α .

3. BIOSYNTHESE DU SQUELETTE

a) Biosynthèse du squelette des OPG linéaires branchés

(1) Biosynthèse chez *Escherichia coli*

Les différentes connaissances acquises sur la biosynthèse des OPG chez *E. coli*, *in vitro* et *in vivo*, ont permis d'élaborer un modèle de travail, représenté Figure 5 page 28.

C'est la découverte fortuite d'un mutant porteur d'une altération d'origine inconnue, déficient dans la synthèse des OPG, qui a permis à Bohin et Kennedy (1984a) d'initier l'étude génétique de la biosynthèse des OPG. La fraction membranaire d'une souche portant cette mutation, *mdoA1*, est inactive dans le système glucosyltransférase d'élongation *in vitro* mis au point par Weissborn et Kennedy (1984). Ce système nécessite une fraction membranaire trypsine-sensible, l'ACP (acyl carrier protein ; Thérisod et coll., 1986), une amorce de type β -glucoside, et utilise l'UDP-glucose comme substrat.

Les produits du système glucosyltransférase *in vitro* sont des oligomères ne contenant que des liaisons β -1,2, ce qui suggère que la ramification en β -1,6 est postérieure à la synthèse de la chaîne β -1,2. La ramification peut donc s'effectuer soit à partir d'UDP-glucose, dans le cytoplasme, par une enzyme spécifique, soit par un réarrangement d'unités de glucose à partir de la chaîne β -1,2. Dans ce dernier cas, la ramification pourrait aussi bien se dérouler dans le cytoplasme que dans le périplasme.

L'unique précurseur du squelette est l'UDP-glucose (Schulman et Kennedy, 1977). En effet, des mutants *galU* (glucose-1-phosphate uridilyl-tyransférase), incapables de synthétiser l'UDP-glucose, ne produisent pas d'OPG.

Le locus *mdoA* est un opéron de deux gènes, *mdoG* et *mdoH* (Lacroix et coll., 1991). Si une mutation dans l'un ou l'autre de ces deux gènes aboli la synthèse d'OPG (Lacroix et coll., 1989, 1991), seuls les mutants *mdoH* sont déficients dans le test glucosyltransférase *in vitro* (Weissborn et Kennedy, 1984 ; Weissborn et coll., 1992).

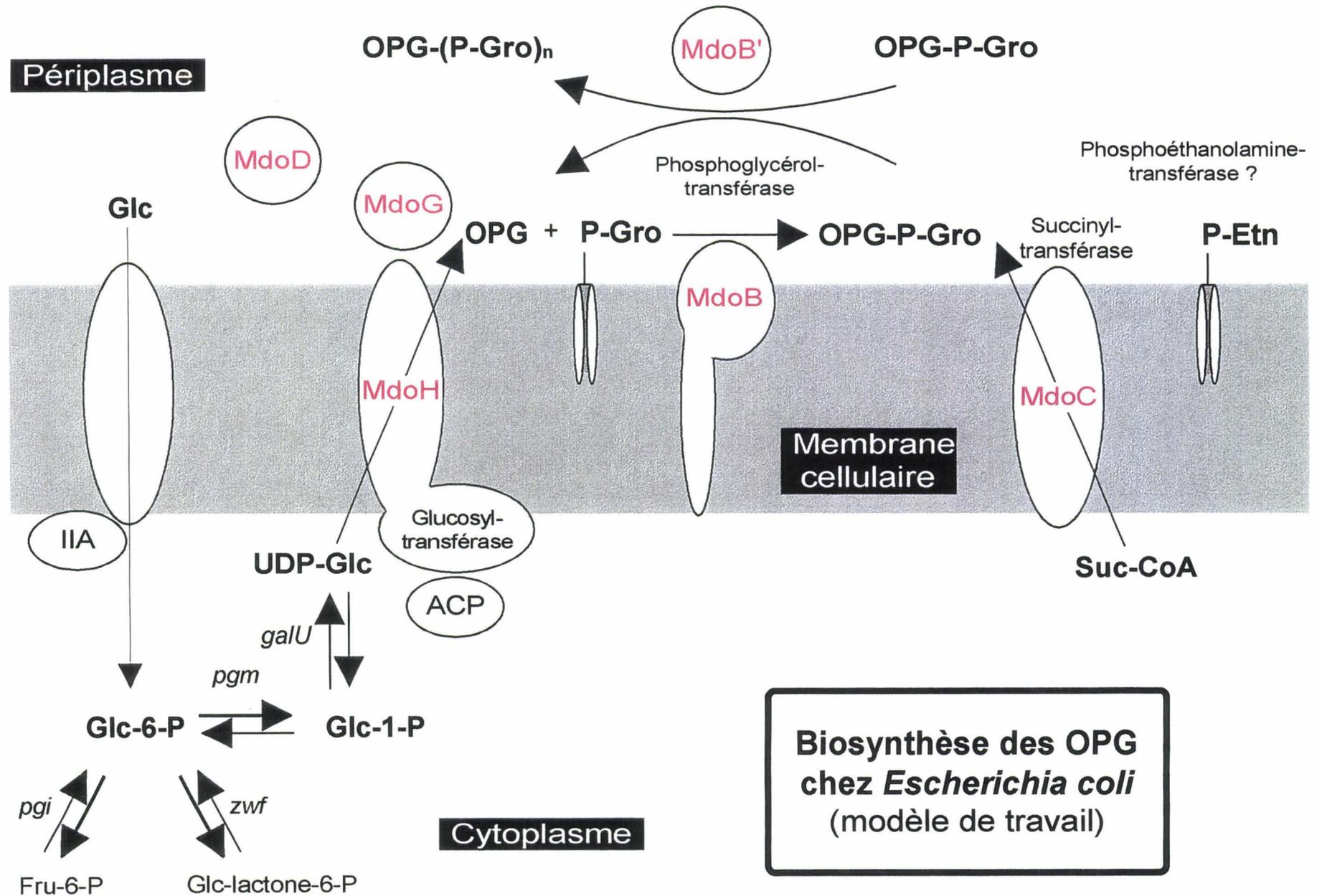
La déficience des mutants de *mdoH* aussi bien *in vivo* que dans le test glucosyltransférase *in vitro* ainsi que la localisation membranaire de son produit ont permis à Loubens et coll. (1993) de conclure que MdoH est la glucosyltransférase du système. MdoH est une protéine de la membrane interne de 97 kDa (Loubens et coll., 1993) possédant huit segments transmembranaires, les extrémités amino et carboxy-terminale étant cytoplasmiques (Debarbieux et coll., 1997).

Les trois grands domaines cytoplasmiques de MdoH sont probablement impliqués dans la polymérisation des unités glucosidiques à partir de l'UDP-glucose, et sans doute dans l'interaction avec l'ACP. L'ACP est une petite protéine thermorésistante de 77 acides aminés portant un groupement phosphopanthéine. Si ce groupement est indispensable dans la biosynthèse des acides gras, des phospholipides et du LPS, il n'est pas nécessaire à la biosynthèse des OPG (Thérisod et Kennedy, 1987). L'interaction de l'ACP avec MdoH pourrait induire un changement de conformation de cette dernière augmentant son efficacité catalytique (Tang et coll., 1997). De plus, la présence de deux petits domaines périplasmiques permet d'envisager des interactions avec d'autres composants de la machinerie de biosynthèse.

Weissborn et coll. (1991) ont proposé que le bactoprénol soit l'accepteur membranaire permettant la translocation des OPG à travers la membrane interne. Ces auteurs ont montré que le système glucosyltransférase *in vitro* est inhibé par la présence de bacitracine ou d'amphotricine. Ces deux antibiotiques complexant les dérivés de polyprénylphosphate, il semble qu'un dérivé prénol soit nécessaire au système glucosyltransférase. Toutefois, Harkness et coll. (1990) ont montré que la synthèse *in vivo* est insensible à l'action de la colicine M (qui inhibe la régénération du bactoprénol) contrairement aux synthèses des autres glycanes de l'enveloppe d'*E. coli* (peptidoglycane, antigène O du LPS, polysaccharides capsulaires K1) qui utilisent le bactoprénol comme accepteur des oligosaccharides. Comme aucun fait expérimental ne permet d'affirmer que le bactoprénol soit l'accepteur et que la présence de huit segments transmembranaires suggère que MdoH pourrait être directement impliquée dans la translocation de la chaîne naissante de polyglucose vers le périplasma (Debarbieux et coll., 1997), il semble que l'hypothèse d'un accepteur lipidique soit à écarter.

mdoG code une protéine périplasmique de 56 kDa (Loubens et coll., 1993) dont la fonction n'a pas été identifiée. MdoG pourrait être soit l'enzyme de branchement réalisant les liaisons β -1,6 soit l'hydrolase clivant la liaison entre les molécules d'OPG et l'accepteur membranaire.

Figure 5 : Modèle de travail de la biosynthèse des OPG chez *E. coli*.



**Biosynthèse des OPG
chez *Escherichia coli*
(modèle de travail)**

Enfin, le séquençage du génome d'*E. coli* (Blattner et coll., 1997) a permis d'identifier *mdoD*, un gène paralogue à *mdoG* codant une protéine périplasmique qui serait impliquée dans le remaniement du squelette des OPG (Lequette, 1998).

(2) Biosynthèse chez *Pseudomonas syringae*

Le séquençage de *mdoGH* a révélé une forte similitude (69% d'identité des séquences nucléotidiques) avec le locus *hrpM* (hypersensitive reaction and pathogenicity) de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, bactérie pathogène du haricot (Loubens et coll., 1993). Le locus *hrpM* est composé de deux phases ouvertes de lecture, ORF1 et ORF2 (Mukhopadhyay et coll., 1988), le gène correspondant à ORF2 étant également dénommé *hrpM*. La forte homologie existant entre *mdoGH* et *hrpM* suggérait une fonction commune, ce qui a été confirmé par la complémentation de la mutation *mdoA200::Tn10* par *hrpM* exprimé sous le contrôle du promoteur *lacUV5* (Loubens et coll., 1992). Dans ce contexte, *hrpM* permet la synthèse d'un glucane identique à celui obtenu par la complémentation avec *mdoH* (Talaga, 1996), et dont la synthèse est osmotiquement régulée.

b) Biosynthèse du squelette des OPG chez les Rhizobiacées

Les membranes isolées de *R. leguminosarum* pv. *phaesoli* (Amemura, 1984), *R. leguminosarum* (Breedveld et coll., 1992), *S. meliloti* (Zorreguieta et coll., 1985), *A. tumefaciens* (Williamson et coll., 1992) et *A. radiobacter* (Amemura, 1984) catalysent la formation de glucanes cycliques liés en β -1,2, à partir d'UDP-glucose. Les OPG produits *in vitro* possèdent la même répartition en taille que les OPG synthétisés *in vivo*.

En 1985, Douglas et coll. identifièrent deux locus chromosomiques d'*A. tumefaciens*, *chvA* et *chvB* (*chv* pour chromosomal yirulence) nécessaires à l'adhésion et à la virulence des bactéries sur les cellules végétales, et Puvanesarajah et coll. (1985) ont montré que les mutants *chvB* ne synthétisent pas d'OPG. Dylan et coll. (1986) ont démontré l'existence de gènes homologues chez 4 espèces de *Rhizobium*, dont *S. meliloti*, où ces gènes ont été dénommés *ndvA* et *ndvB* (*ndv* pour nodule development), du fait que les mutants *ndvA* et *ndvB* provoquent la formation chez la luzerne de nodules vides de bactéroïde, inefficaces dans la fixation de l'azote. De plus, ces mutants n'accumulent plus d'OPG dans leur périplasme (Stanfield et coll., 1988 ; Ielpi et coll., 1990).

Ces deux couples de gènes sont très conservés et les mutations *chvA* et *chvB* peuvent être complémentées par un cosmide portant *ndvA* et *ndvB* (Dylan et coll., 1986), par contre

aucune similitude de séquence n'existe avec *mdoGH* (Loubens et coll., 1993). Dans tout les cas, ces gènes sont chromosomiques (Dylan et coll., 1986 ; Van Veen et coll., 1987), adjacents et divergents (Douglas et coll., 1985 ; Ielpi et coll., 1990). Altabe et coll. (1990) ont suggéré que seuls ces 2 gènes sont nécessaires à la biosynthèse des OPG cycliques liés en β -1,2.

Par complémentation d'une souche *ndvB* de *S. meliloti*, Bhagwat et coll. (1993) ont cloné le gène *ndvB* de *B. japonicum*, dont l'inactivation supprime la synthèse d'OPG. En amont de ce locus se trouve le locus *ndvC*, les mutants *ndvC* produisant des glucanes localisés dans le périplasme mais uniquement liés par des liaisons β -1,3. NdvC est une protéine de 62 kDa, vraisemblablement localisée dans la membrane interne et qui catalyserait la formation des liaisons β -1,6 (Bhagwat et coll., 1996).

(1) Les protéines ChvA et NdvA

Les gènes *ndvA* et *chvA* codent respectivement des protéines de 67 et 65 kDa (Stanfield et coll., 1988 ; Iñón de Iannino et Ugalde, 1989 ; Cangelosi et coll., 1989). Ces protéines présentent une similitude de 76% entre elles et sont fortement similaires à la protéine HlyB d'*E. coli* appartenant à la famille de transporteur de type ABC (Stanfield et coll., 1988 ; Cangelosi et coll., 1989). Les mutants *ndvA* et *chvA* n'excrètent pas d'OPG dans le milieu (Stanfield et coll., 1988 ; Iñón de Iannino et Ugalde, 1989 ; O'Connell et Handelsman, 1989) et n'accumulent pas d'OPG dans leur périplasme (Stanfield et coll., 1988 ; Cangelosi et coll., 1989). Un mutant *ndvA* accumule dans son cytoplasme des OPG non substitués de distribution en taille identiques à celle d'une souche sauvage (Breedveld et coll., 1994), NdvA et ChvA ne sont donc pas impliquées dans les processus d'élongation et de cyclisation. Par contre, le caractère neutre des OPG accumulés dans une souche *ndvA* démontre que ces protéines sont impliquées dans l'exportation des OPG vers le périplasme, où a lieu la substitution. L'excrétion des OPG dans le milieu, qu'elle soit active ou passive, est donc un processus biphasique et les OPG sont d'abord exportés dans le périplasme. Le mécanisme de ce transport est inconnu, mais pourrait également impliqué NdvB et ChvB, car des expériences de digestion partielle à la trypsine ont montré que ChvA et ChvB pourraient former des complexes au sein de la membrane interne (Iñón de Iannino et Ugalde, 1989).

(2) Les protéines NdvB et ChvB

Les gènes *ndvB* et *chvB* codent des protéines de la membrane interne de haute masse moléculaire (319 kDa) impliquées dans la biosynthèse des OPG cycliques liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose (Zorreguieta et Ugalde, 1986 ; Geremia et coll., 1987 ; Zorreguieta et coll., 1988 ; Ielpi et coll., 1990). Ces protéines semblent être impliquées dans toutes les étapes de la biosynthèse, c'est à dire initiation, élongation et cyclisation (Castro et coll., 1996 ; Ingram-Smith et Miller, 1998) et sont liées de manière covalente à la chaîne glucanique en cours d'élongation (Zorreguieta et Ugalde, 1986). Il a également été proposé que ces protéines soient impliquées dans d'autres processus que la biosynthèse des OPG, car seuls les premiers 60% des acides aminés sont nécessaires à cette biosynthèse (Zorreguieta et coll., 1988 ; Ielpi et coll., 1990 ; Bhagwat coll., 1992 ; Breedveld et coll., 1994).

4. SUBSTITUTION

a) Substitution par le phosphoglycérol

Deux activités phosphoglycérol-transférase ont été mises en évidence chez *E. coli*. La phosphoglycérol-transférase I est une enzyme liée à la membrane interne, qui catalyse le transfert de phosphoglycérol, à partir du phosphatidylglycérol, sur les OPG (Jackson et Kennedy, 1983) mais aussi sur des β -glucosides comme l'arbutine servant d'accepteurs artificiels (Bohin et Kennedy, 1984b) ce qui a permis aux auteurs de démontrer que le site actif est situé sur la face externe de la membrane interne. La phosphoglycérol-transférase II est une enzyme périplasmique de 56 Kda qui catalyse le transfert de phosphoglycérol d'une molécule d'OPG à une autre (Goldberg et coll., 1981). Le transfert du phosphoglycérol par la phosphoglycérol-transférase II s'effectuerait à partir des molécules d'OPG naissantes vers des molécules libres dans le périplasme (Jackson et Kennedy, 1983). Les molécules donnatrices seraient alors susceptibles de recevoir un nouveau résidu de phosphoglycérol sous l'action de la phosphoglycérol-transférase I.

Des mutants bloqués dans le transfert du phosphoglycérol sur les OPG et sur l'arbutine ont été obtenus indépendamment par Jackson et coll. (1984) et Rotering et coll. (1984). Toutes les mutations obtenues ont été cartographiées à 99 minutes, au niveau d'un locus unique, *mdoB* (Jackson et coll., 1984 ; Fiedler et Rotering, 1985 ; Lanfroy et Bohin, 1993). Le produit de *mdoB* existerait sous deux formes (Lanfroy, 1997) : MdoB, une protéine de 85 kDa liée à la membrane interne par quatre segments transmembranaires et possédant l'activité

phosphoglycérol-transférase I ; MdoB', une protéine périplasmique produit de clivage de MdoB possédant l'activité phosphoglycérol-transférase II (Lequette, 1998).

b) Substitution par la phosphoéthanolamine

La phosphatidyléthanolamine est le précurseur des phosphoéthanolamines transférées sur les OPG (Miller et Kennedy, 1987), mais l'activité phosphoéthanolamine transférase n'a pas été caractérisée.

c) Substitution par le succinate

Récemment, Eric Lanfroy a obtenu des mutants d'*E. coli* déficients dans la succinylation (Lacroix et coll., résultats non publiés). Le clonage de la mutation, ainsi que des études génétiques et moléculaires, ont permis de localiser le locus correspondant, *mdoC*, immédiatement en amont du locus *mdoGH*, *mdoC* étant transcrit de manière divergente. MdoC est une protéine membranaire de 385 acides aminés et posséderait 10 segments transmembranaires. L'origine du succinate est actuellement totalement inconnue. Celui-ci pourrait être puisé dans le pool de succinyl-CoA cytoplasmique, hypothèse émise dans le cas de la substitution du succinoglycane de *S. meliloti* (Glucksmann et coll., 1993).

Chez *E. chrysanthemi*, la substitution des OPG varie en fonction de l'osmolarité (Talaga, 1996). En effet, à basse osmolarité, ces OPG sont faiblement substitués par des résidus de succinate, alors que lorsque l'osmolarité du milieu augmente, leur abondance diminue et la substitution par les résidus de succinate augmente, avec notamment l'apparition de molécules polysubstituées. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce phénomène : le taux de transfert est constant et la diminution de la quantité de substrat à haute osmolarité entraîne une augmentation relative de la substitution ; ou le taux de transfert est osmotiquement régulé et augmente avec l'osmolarité. Dans les deux cas, la situation est différente de celle existant chez *E. coli*, où la substitution ne semble pas modifiée en fonction de l'osmolarité.

d) Substitution chez les Rhizobiacées

La substitution par le phosphoglycérol est réalisée dans le périplasme (Breedveld et coll., 1994 ; Breedveld et Miller, 1995), à partir du phosphatidylglycérol (Miller et coll., 1988), les OPG neutres étant les précurseurs des OPG substitués. La substitution par le succinate est également réalisée dans le périplasme (Breedveld et coll., 1995b). Les

conditions de croissance affectent la substitution. Ainsi, chez *S. meliloti*, la substitution est plus rapide en phase exponentielle (Geiger et coll., 1991), et est inhibée à haute osmolarité (Breedveld et Miller, 1995). D'autre part, en condition de carence en phosphate, la substitution par le phosphoglycérol disparaît et la substitution par le succinate augmente alors que, dans les mêmes conditions, *A. tumefaciens* ne produit que des OPG neutres (Breedveld et coll., 1995a).

5. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE

a) Régulation osmotique

La biosynthèse des OPG est régulée par l'osmolarité du milieu de croissance (Kennedy, 1982). Chez *E. coli*, les OPG peuvent représenter jusqu'à 5% du poids sec des bactéries à très basse osmolarité (70 mosM), alors qu'ils ne représentent, à haute osmolarité (670 mosM), pas plus de 0,5%. Cette régulation concerne essentiellement la biosynthèse du squelette glucosidique. Deux mécanismes de régulation, non mutuellement exclusifs, sont envisageables : une régulation de l'activité enzymatique de synthèse par la force ionique du cytosol, qui varie en fonction de l'osmolarité du milieu de croissance (Higgins et coll., 1987), et une régulation génétique de l'expression des enzymes de biosynthèse en fonction de l'osmolarité.

Rumley et coll. (1992) ont montré que l'activité glucosyltransférase *in vitro* est indépendante de l'osmolarité du milieu de croissance des souches servant à la préparation du constituant membranaire du système. De plus, l'adjonction de NaCl, KCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inhibe cette activité. Cependant, l'adjonction de glutamate de potassium n'a que peu d'influence et l'adjonction de proline, de bétaine de tréhalose (les principaux solutés compatibles accumulés par *E. coli*) ou encore de saccharose n'affecte pas l'activité glucosyltransférase. Il semble donc que cette activité soit sensible à la force ionique et non à l'osmolarité elle-même. Or, l'accumulation d'ions potassium, bien que constituant la réponse primaire à un choc hyperosmotique, n'est que transitoire, ces ions étant remplacés par des solutés compatibles (Csonka et Epstein, 1996), alors que le taux de synthèse des OPG est, en phase exponentielle, constant pour une osmolarité donnée (Lacroix, 1989). Néanmoins, une augmentation brutale de l'osmolarité entraîne une chute brutale du taux de synthèse jusqu'à une valeur identique à celle observée à la même osmolarité dans une culture équilibrée, suggérant que soit l'une des protéines a un taux de renouvellement très rapide, soit l'activité de synthèse est inhibée sans pour autant que ces hypothèses soient exclusives (Bohin et Kennedy, 1984b ; Lacroix, 1989).

Arguant du fait que l'accumulation d'OPG est quasi immédiate lors d'un transfert de haute à basse osmolarité, Rumley et coll. (1992) ont proposé que les enzymes soient constitutives. Cependant, après une diminution brutale de l'osmolarité, le taux de synthèse des OPG n'augmente que progressivement jusqu'à un taux maximum atteint après deux générations (Lacroix, 1989). De plus, l'addition de chloramphénicol ou de rifampicine lors du changement d'osmolarité supprime l'augmentation du taux de synthèse, la synthèse d'ARN messager et de protéine est donc nécessaire (Kennedy, 1982 ; Lacroix, 1989).

L'expression de l'opéron *mdoGH* est soumise à une régulation par l'osmolarité du milieu de croissance. En effet, l'expression d'une protéine de fusion MdoH''LacZ est sept fois plus importantes à 70 mosM qu'à 670 mosM et la quantité d'ARN messager de l'opéron *mdoGH* est cinq fois plus importante à basse osmolarité (Lacroix et coll., 1991). Si cette régulation n'est pas affectée par les mutations *mdoH200::Tn10* ou *mdoG202::neo*, la mutation *mdoA1* abolit la régulation osmotique de l'expression de la fusion MdoH''LacZ. La régulation osmotique est donc indépendante de la présence d'OPG, et MdoH pourrait être impliquée dans cette régulation. Enfin, des mutations de *envZ*, *rpoS*, *himA*, *himD*, *lrp* ou *hns*, gènes impliqués dans la régulation de la balance des porines n'affectent pas la régulation osmotique de la biosynthèse des OPG (Lacroix, communication personnelle).

Cependant, la régulation au niveau génétique reste soumise à controverse (Kennedy, 1996), car l'ensemble de ces résultats a été obtenu en utilisant des plasmides à copies multiples. En effet, l'opéron *mdoGH* est très faiblement exprimé, les ARN messager ne pouvant être détecté que si l'opéron *mdoGH* est en copies multiples. Cette faiblesse d'expression est contradictoire avec le score élevé (57%) de similitude au consensus du promoteur de *mdoGH* (Loubens et coll., 1993), ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de repression.

b) Surexpression des gènes de biosynthèse

L'expression de *mdoGH* à partir d'un plasmide à copies multiples conduit à une augmentation d'un facteur trois de la biosynthèse des OPG (Lacroix et coll., 1989), sans altérer la régulation osmotique et sans que l'on puisse détecter une surproduction de l'une ou l'autre des protéines (Tempête et Bohin, résultat non publié). Par contre, l'expression de *mdoG* seul conduit à la surproduction de MdoG, tout en permettant la même augmentation de la biosynthèse (Loubens et coll., 1993). Debarbieux et coll. (1997) ont montré que, si *mdoGH* est exprimé en copies multiples sous le contrôle du promoteur du phage T7, MdoG est

surproduit, sa préprotéine lentement maturée, et MdoH est beaucoup moins exprimée que MdoG. De plus, l'expression de *mdoH* seul ne conduit qu'à une augmentation d'un facteur 1,5 de la biosynthèse du MDO. MdoG pourrait donc être la seule protéine limitante du système de biosynthèse. MdoH est probablement présente en très faible quantité, l'expression de MdoH pouvant être réduite d'une part parce que *mdoH* chevauche légèrement *mdoG* et qu'il n'y a pas de séquence de fixation de ribosome en amont de *mdoH*, ce qui peut produire une différence d'efficacité de traduction des deux protéines ; d'autre part parce que la localisation membranaire de MdoH peut limiter sa production.

c) **Rétrocontrôle**

Un rétrocontrôle de la biosynthèse, par les OPG eux-mêmes ou par un intermédiaire de biosynthèse, existe également (Lacroix, 1989 ; Rumley et coll., 1992). En effet, le taux initial de synthèse est beaucoup plus élevé chez des bactéries dépourvues d'OPG (souche *pgi zwf* cultivée en absence de glucose) que chez celles qui en contiennent normalement. De plus, Clark (1984) a isolé une souche hypersensible à certains antibiotiques qui s'est révélée hyperproductrice d'OPG (d'un facteur 6 à 70 mosM ; Kennedy et Rumley, 1988). Dans cette souche, la régulation osmotique n'est pas modifiée et la majeure partie des OPG produits est relarguée dans le milieu. Il est probable que l'altération de l'enveloppe conduisant à l'hypersensibilité aux antibiotiques est responsable d'une « fuite » des OPG, ce qui supprime le rétrocontrôle.

d) **Régulation en fonction de la phase de croissance**

La synthèse des OPG dépend de la phase de croissance puisque, dans une culture équilibrée d'osmolarité fixe, le taux de synthèse est constant durant la phase exponentielle de croissance mais devient nul deux heures environ après le début de la phase stationnaire (Lacroix, communication personnelle).

e) **Régulation chez les Rhizobiacées**

Très peu de données sont actuellement disponibles en ce qui concerne les mécanismes de régulation chez les rhizobiacées, où la synthèse des OPG est osmorégulée avec un niveau de régulation comparable à celui décrit pour *E. coli* (Miller et coll., 1986 ; Dylan et coll., 1990a ; Breedveld et coll., 1990). Les activités des systèmes glucosyl-transférase d'*A. tumefaciens* et de *S. meliloti* sont indépendantes de l'osmolarité du milieu de croissance des

souches servant à la préparation des membranes et sont réduites par la présence d'osmolytes ioniques, mais pas par la présence d'osmolytes neutres (Zorreguieta et coll., 1990). D'autre part, comme chez *E. coli*, la synthèse semble soumise à un contrôle en retour (Breedveld et coll., 1992).

6. LES FONCTIONS DES OPG

La très grande diversité des caractéristiques structurales des OPG semble *a priori* incompatible avec une fonction commune (Figure 6 page 37). Cependant, les caractères propres à ces composés que sont la composition glucosidique du squelette, leur localisation périplasmique et la régulation osmotique de leur synthèse suffisent à la définition d'une famille cohérente. Cette classification unitaire est renforcée par l'analyse phénotypique de mutants au sein des différents groupes d'OPG, qui a révélée la possibilité d'une connexité de fonction.

a) Implication des OPG dans le renouvellement des phospholipides membranaires

Du fait que de nombreuses espèces produisent des OPG non substitués par le phosphoglycérol et la phosphoéthanolamine, la fonction primaire des OPG ne semble pas être le renouvellement des phospholipides membranaires. Néanmoins, étant donné que la substitution par le phosphoglycérol et la phosphoéthanolamine chez *E. coli* et par le phosphoglycérol chez *S. meliloti* et *A. tumefaciens* s'effectue à partir de la tête polaire des phospholipides membranaires, les OPG sont, chez ces espèces, directement impliqués dans le renouvellement de ces phospholipides. Ainsi, Schulman et Kennedy (1977) ont estimé que, chez *E. coli*, 90% du renouvellement du phosphatidylglycérol se fait par transfert de sa tête polaire sur les OPG et Miller et coll. (1988) ont estimé que 60% du renouvellement des phospholipides chez *S. meliloti* implique les OPG. Il est donc possible que *E. coli* et *S. meliloti* utilisent ce substrat de manière opportuniste pour réguler le ratio des phospholipides, alors que les autres espèces utilisent d'autres molécules. Cependant, une mutation *mdoB* n'affecte pas le taux de diacylglycérol membranaire (Jackson et coll., 1984 ; Rotering et coll., 1984), probablement parce que la substitution par la phosphoéthanolamine est augmentée dans un contexte *MdoB*⁻ (Rotering et coll., 1984). De plus, ni les mutants *mdoB* d'*E. coli* (Jackson et coll., 1984 ; Rotering et coll., 1984) ni le mutant S9 de *S. meliloti* déficient dans la substitution par le phosphoglycérol (Breedveld et coll., 1995b) ne présentent de phénotype de croissance.

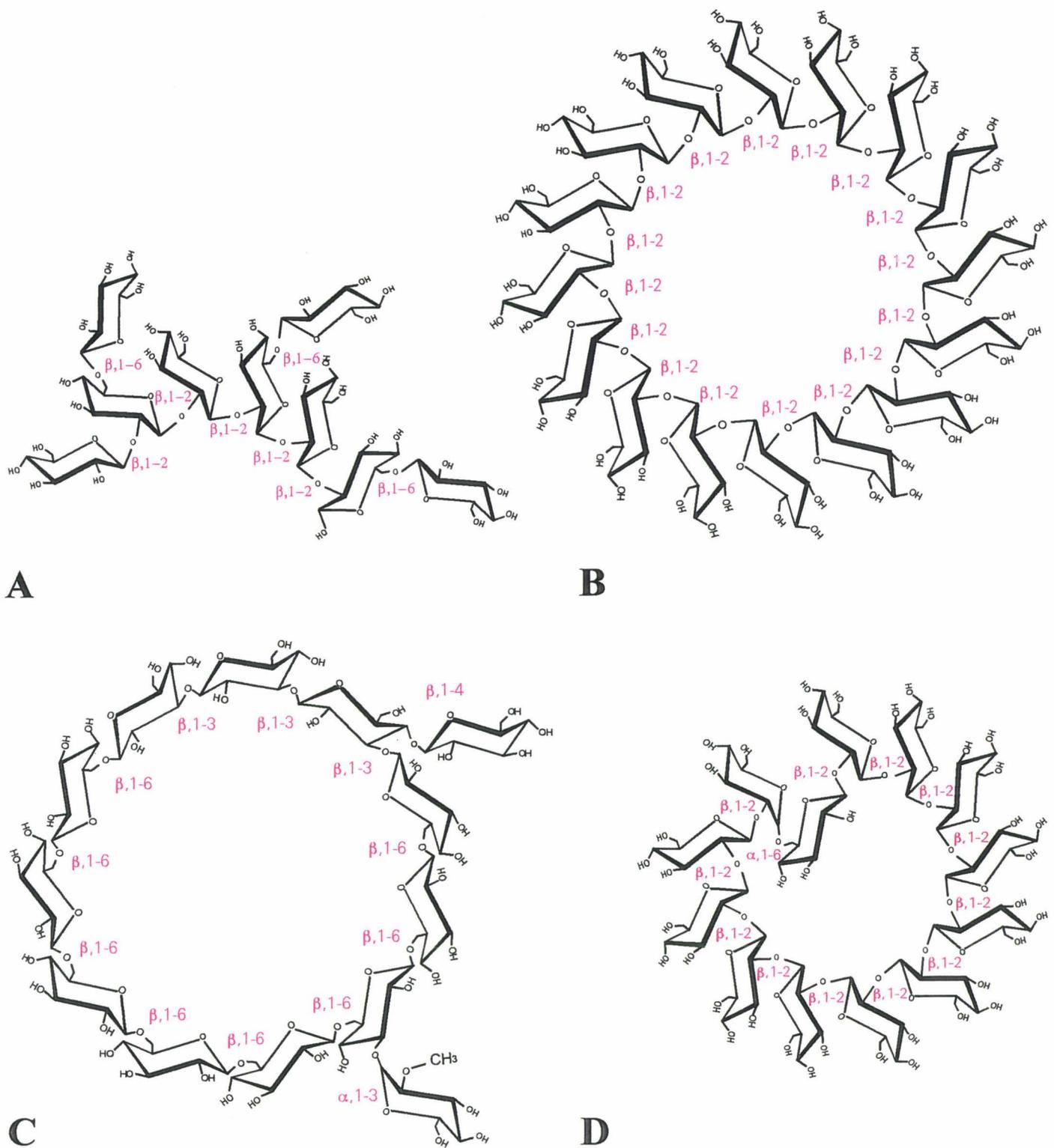


Figure 6 : Quelques exemples de la diversité structurale des OPG. **A)** OPG produit par *E. chrysanthemi*. **B)** OPG cyclique tout β à 16 résidus de glucose. **C)** OPG cyclique complexe produit par *A. brasilense*. **D)** OPG α - β produit par *R. solanacearum*.

b) Implication des OPG dans l'adaptation à l'osmolarité

L'accumulation d'OPG à basse osmolarité est susceptible de modifier fortement les propriétés physico-chimiques du périplasme. Stock et coll. (1977) ont proposé que le périplasme soit en équilibre osmotique avec le cytoplasme et Sen et coll. (1988) que, chez *E. coli*, les OPG contribuent pour une large part au maintien du potentiel de Donnan.

Kennedy (1996) ainsi que Breedveld et Miller (1994) ont proposé que les OPG (i) permettent aux bactéries de contrôler le volume des compartiments cytoplasmiques et périplasmiques ; (ii) par leur caractère anionique, contribuent à la force ionique du périplasme ; (iii) par leur charge et leur impossibilité de diffuser à travers la membrane externe, participent au potentiel de Donnan de part et d'autre de la membrane externe ; (iv) par leur forte concentration, diminuent la pression de turgescence s'exerçant sur la membrane interne. De fait, les mutants *chvA* et *chvB* d'*A. tumefaciens* et *ndvA* et *ndvB* de *S. meliloti* sont affectés dans la croissance à très basse osmolarité, alors qu'à haute osmolarité, la croissance est identique à celle d'une souche sauvage (Cangelosi et coll., 1990 ; Dylan et coll., 1990a ; Zorreguieta et coll., 1990). La croissance à basse osmolarité des mutants *exoC* (codant la phosphoglucomutase, enzyme impliquée dans la synthèse de l'UDP-glucose) est également affectée (Dickstein et coll., 1988).

Cependant, la croissance des mutants *mdoA* d'*E. coli* n'est pas affectée à basse osmolarité (Bohin et Kennedy, 1984a). De plus, les fonctions présumées des OPG dans l'adaptation à des milieux de basse osmolarité sont inféodées à leur caractère anionique, et l'augmentation de la substitution par le succinate dans le mutant S9 de *S. meliloti* peut-être considérée comme un mécanisme compensatoire visant à maintenir le caractère anionique des OPG (Breedveld et coll., 1995b). Cependant, chez *E. coli*, aucun phénotype n'est associé aux mutations *mdoB* alors que dans ce contexte on observe une augmentation de la substitution par la phosphoéthanolamine et non de la substitution par le succinate, d'où une perte considérable de charges négatives (Fiedler et Rotering, 1985). De plus, les OPG produits par *P. syringae* (Talaga et coll., 1994), certaines souches de *R. leguminosarum* et *Rhizobium sp.* GRH2 (Zevenhuizen et coll., 1990 ; Lopez-Lara et coll., 1993) ne sont pas substitués. Par conséquent, si les OPG substitués contribuent au maintien d'un potentiel de Donnan, cette fonction doit être dévolue à d'autres molécules chez les espèces produisant des OPG neutres. Enfin, il a été publié que la quantité cellulaire d'OPG chez certaines souches de *R. leguminosarum* (Breedveld et coll., 1991) et chez *Brucella spp.* (Briones et coll., 1997) est indépendante de l'osmolarité et que la synthèse d'OPG n'est pas osmorégulée chez *S. meliloti*

GR4 (Soto et coll., 1993), ce qui pourrait indiquer que la fonction primaire des OPG n'est pas l'adaptation à des conditions de basse osmolarité.

c) Implication des OPG dans les relations bactéries-hôtes

Les preuves les plus directes du rôle des OPG dans les processus d'infection des plantes proviennent de l'étude phénotypique de mutants *Opg*⁻. En effet, les mutants *chvA/chvB* d'*A. tumefaciens* (Douglas et coll., 1985) et les mutants *hrpM* de *P. syringae* (Mukhopadhyay et coll., 1988) sont avirulents et les mutants *ndvA/ndvB* de *S. meliloti* (Dylan et coll., 1986 ; Dylan et coll., 1990b) ainsi que les mutants *ndvB* de *B. japonicum* (Bhagwat et Keister, 1995 ; Dunlap et coll., 1996) induisent la formation de nodules vides de bactéroïdes, inefficaces dans la fixation de l'azote, chez la luzerne et le soja respectivement. Par contre, le mutant S9 de *S. meliloti*, bloqué dans le transfert du phosphoglycérol, induit la formation de nodules actifs dans la fixation de l'azote (Breedveld et coll., 1995b).

Les mutants *ndvA/ndvB* de *S. meliloti* ne sont que faiblement affectés dans leur capacité d'induire la courbure des poils absorbants (Dylan et coll., 1986) mais sont par contre fortement affectés dans l'attachement et l'initiation du cordon d'infection (Puvanesarajah et coll., 1985 ; Dylan et coll., 1990b). La recherche de suppresseurs extragéniques a permis d'isoler des révertants de symbiose (Dylan et coll., 1990b). Ces révertants, bien que formant un nombre de cordons d'infection très inférieur par rapport à une souche sauvage, forment des nodules pleins, alors que la synthèse d'OPG n'est pas restaurée et que le phénotype pléiotrope des mutants (voir paragraphe 4) n'est pas modifié. La suppression du phénotype de symbiose est liée à une modification de la quantité d'EPS (Nagpal et coll., 1992). Un cosmide permettant de compléter le défaut de symbiose a été isolé d'une banque d'ADN chromosomique d'un révertant et s'est révélé porteur d'au moins 2 gènes impliqués dans la production d'EPS, *exoH* et *exoF* (Nagpal et coll., 1992). Les mutants *exo* ayant un phénotype de symbiose indiscernable de celui des mutants *ndv* (Leigh et coll., 1985 ; Norris et coll., 1991), ces résultats suggèrent que les EPS et les OPG interviennent au même moment dans l'interaction bactérie-plante.

L'addition d'OPG exogènes lors de l'inoculation de souches *ndv* sur les légumineuses ne permet pas le rétablissement de la symbiose (Dylan et coll., 1990b). Par contre, cette addition augmente à la fois le nombre de nodules et la cinétique de leur formation lors d'inoculations de souches sauvages de *S. meliloti* (Bhagwat et coll., 1992 ; Dylan et coll., 1990b) ou de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Abe et coll., 1982).

Ces résultats suggèrent que l'établissement de la symbiose nécessite à la fois la présence d'OPG cellulaires et d'OPG extracellulaires. Cependant, les OPG ne sont pas impliqués dans le déterminisme de la spécificité d'hôte. En effet, il n'existe pas de différence détectable parmi les OPG produits par les différents biovars de *R. leguminosarum* (Zevenhuizen et coll., 1990), et *R. fredii* et *B. japonicum*, bien que produisant des OPG de familles différentes, sont deux espèces symbiotiques du soja. Enfin, les gènes gouvernant la synthèse des OPG liés en β -1,3 et β -1,6 de *B. japonicum* permettent de compléter le défaut de symbiose d'un mutant *ndvB* de *S. meliloti* (Bhagwat et coll., 1993).

L'analogie structurale existant entre les OPG cycliques et les cyclodextrines, et le fait que les cyclodextrines forment des complexes avec divers composés hydrophobes (Szejtli, 1990) suggèrent que les OPG pourraient interagir avec des métabolites de l'hôte. De fait, Morris et coll. (1991) ont montré que la solubilité de la naringénine (un des flavonoïdes végétaux inducteurs de l'expression des gènes *nod* chez *Rhizobium*) est accrue en présence d'OPG cycliques liés en β -1,2, ce qui pourrait expliquer la stimulation de la nodulation par l'addition d'OPG exogènes.

Les OPG de *B. japonicum* sont structuralement proches des glucanes β -1,3 β -1,6 dérivés de la paroi des champignons pathogènes *Phytophthora sojae* (Ayers et coll., 1976) et *P. megasperma* (Sharp et coll., 1984 ; Darvill et Albersheim, 1984), qui sont des éliciteurs puissants de la synthèse de phytoalexines chez le soja (Ebel et Grisebach, 1988). Or, contrecarrer les défenses de l'hôte est primordial à l'établissement de la symbiose (Long et Staskawicz, 1993). Gore et Miller (1993) ont montré que les bactéroïdes produisent des quantités importantes d'OPG. D'autre part, Mithöfer et coll (1996) ont montré que les OPG sont des inhibiteurs compétitifs des β -glucanes de *P. sojae* pour la fixation sur leur récepteur, mais que les OPG ne sont pas éliciteurs de la synthèse de phytoalexines. Néanmoins, le caractère « non éliciteur » des OPG reste soumis à controverse. Ainsi, Breedveld et Miller (1994) et Miller et coll. (1994) ont proposé que les OPG soient éliciteurs d'une distribution de phytoalexines différente de la distribution provoquée par les β -glucanes de champignon. Les OPG pourraient donc contrecarrer la stimulation des défenses de l'hôte et seraient de ce fait indispensables à l'établissement de la symbiose. Un rôle équivalent a été proposé chez *R. leguminosarum*, du fait que l'inoculation de mutants *opg* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* induit l'expression de la chalcone-synthase, enzyme clé de la biosynthèse des phytoalexines (Yang et coll., 1992).

Les mutants *hrpM* de *P. syringae* pv. *syringae* ne provoquent aucun symptôme sur les plantes hôtes comme le haricot, ni de réaction d'hypersensibilité chez les plantes non hôtes comme le tabac (Mills et Niepold, 1987). En fait, il semble que les mutants *hrpM* soient incapables de croître *in planta* (Bertoni et Mills, 1987), ce qui pourrait expliquer l'absence de réactions d'hypersensibilité chez les plantes non-hôtes, puisque celle-ci nécessite une période de croissance du pathogène (Klement, 1982). Les OPG produits par *P. syringae* étant linéaires branchés non substitués et n'étant pas excrétés, ni le caractère cyclique ni le caractère anionique ni la localisation extracellulaire des OPG ne semblent être des caractéristiques essentielles à leur(s) rôle(s) dans les relations bactérie-hôte. Par contre, les mutants de *Shigella flexneri* dépourvus d'OPG présentent une virulence identique à celle d'une souche sauvage dans les tests de virulence au laboratoire (Loubens, 1993). Néanmoins, il est possible qu'il existe un mécanisme compensatoire chez *S. flexneri* et les autres bactéries pathogènes d'animaux, ou encore que l'atténuation de la virulence ne soit pas perceptible à l'échelle des tests de laboratoire. En effet, rien n'indique que les capacités à coloniser et à persister dans un organisme hôte entier soient intactes.

d) Implication des OPG dans l'intégrité de l'enveloppe

Le phénotype des mutants Opg^- peut également être la conséquence indirecte de l'absence d'OPG, en particulier si l'on considère son caractère pléiotrope. En effet, certaines propriétés de l'enveloppe sont altérées dans un contexte Opg^- et se traduisent, chez les Rhizobiacées, par (i) une motilité réduite accompagnée d'une diminution du nombre de flagelle (Cangelosi et coll., 1990 ; Dylan et coll., 1990a) ; (ii) une résistance à l'action de certains bactériophages (Dylan et coll., 1986 ; Cangelosi et coll., 1990) ; (iii) une plus grande sensibilité à certains antibiotiques (Dylan et coll., 1986 ; Dylan et coll., 1990a). Chez *S. meliloti*, ces phénotypes sont, tout comme le phénotype de croissance, observés dans des milieux de basse osmolarité et sont partiellement supprimés par une élévation de l'osmolarité (Dylan et coll., 1990a). Par contre, la réduction de la motilité observée chez *A. tumefaciens* est indépendante de l'osmolarité (Cangelosi et coll., 1990).

La preuve la plus significative de l'effet indirect des mutations Opg^- est que les mutants *chvB* d'*A. tumefaciens* ne produisent plus une rihcadhésine active (Swart et coll., 1993). Or, chez *A. tumefaciens*, l'attachement aux cellules végétales est un processus biphasique, médié d'abord par la rihcadhésine, une protéine bactérienne fixatrice de calcium puis, en fonction des conditions de croissance des bactéries, par des fibrilles de cellulose

d'origine bactérienne ou des lectines végétales (Smit et coll., 1992). L'ajout de rhicadhésine active exogène restaure partiellement l'attachement aux cellules végétales, ainsi que le phénotype de virulence des mutants *chvB* (Swart et coll., 1993). Enfin, Swart et coll. (1994) ont montré que les mutants *chvB* cultivés dans un milieu de haute osmolarité et de forte concentration en calcium produisent à nouveau une rhicadhésine active et sont virulents autant qu'une souche sauvage.

L'organisation de l'enveloppe semble être également fortement perturbée chez les mutants *Opg⁻* d'*E. coli*. Ceux-ci présentent également une motilité réduite accompagnée d'une réduction du nombre de flagelle (Fiedler et Rotering, 1988) et résistent à la protéine de lyse du phage MS2 qui ne s'intègre plus dans la membrane interne (Höltje et coll., 1988). Enfin, il semble que les OPG influencent le fonctionnement des porines (Delcour et coll., 1992).

En fait, il semble que ce soit la concentration périplasmique d'OPG qui influence la structure de l'enveloppe. A haute osmolarité, la quantité d'OPG est réduite alors que le volume du périplasma diminue (Larsen et coll., 1987 ; Cayley et coll., 1991), il est donc possible, même si la mesure du volume périplasmique est difficile et approximative, que la concentration périplasmique d'OPG soit constante quelle que soit l'osmolarité du milieu. Les OPG pourraient ainsi être requis à la synthèse, la stabilité ou au fonctionnement de certains constituants de l'enveloppe, ce qui expliquerait le phénotype pléiotrope des mutants *Opg⁻*. L'analyse phénotypique de mutants de *S. meliloti* a permis d'étudier l'influence de la concentration périplasmique d'OPG. En effet, chez cette espèce, des mutations *ndvB* aboutissant à une protéine tronquée de 15 à 40% de son extrémité carboxy-terminale permettent la synthèse d'OPG identiques à ceux d'une souche sauvage (Breedveld et coll., 1994), mais à un niveau inférieur de 60 à 80%. Or, les phénotypes associés à ces délétions sont intermédiaires entre le phénotype sauvage et celui d'un mutant *NdvB⁻*, et ces mutants induisent à la fois, sur la même plante, la formation de pseudonodules et de nodules efficaces dans la fixation de l'azote (Ielpi et coll., 1990). D'autre part, chez *E. coli*, les mutations *tolA* et *tolB* semblent favoriser la sélection de mutations secondaires qui soit abolissent la synthèse des OPG (mutations *mdoH*, Debarbieux et Bohin, communication personnelle) soit entraîne une surproduction avec « fuite » consécutive d'OPG (Lanfroy, 1997). Il est donc probable que la perturbation de l'enveloppe consécutive aux mutations *tol* soit atténuée par une modification de l'accumulation périplasmique des OPG.

e) Les OPG en tant que molécule signal

Chez *E. coli*, les OPG ne sont jamais dégradés (Bohin, communication personnelle), et aucune activité β -glucanase n'a jamais été observée chez les *Rhizobiaceae* (Breedveld et Miller, 1994). La quantité d'OPG rend donc compte non seulement de l'osmolarité du milieu, mais aussi des antécédants de chaque cellule, notamment lors de transfert de basse à haute osmolarité, puisque la quantité d'OPG n'est alors diminuée que par les divisions. Il est donc tentant de supposer que les OPG pourraient constituer, à l'instar du potassium lors de chocs hyperosmotiques, le messager secondaire des conditions de basse osmolarité.

Ainsi, Fiedler et Rotering (1988) ont montré que les mutants Opg^- d'*E. coli* présentent une motilité réduite, accompagnée d'une réduction du nombre de flagelles, qui ne s'observe normalement qu'à haute osmolarité. Ces auteurs ont obtenu des mutations dans *envZ* suppressives du phénotype non motile, et ont émis l'hypothèse que EnvZ puisse détecter la quantité périplasmique d'OPG, arguant du fait que la balance des porines est perturbée à très basse osmolarité et est semblable à celle d'une souche sauvage dans des conditions de haute osmolarité. Geiger et coll. (1992) ont montré qu'en fait, dans des milieux de très basse osmolarité, les OPG sont indispensables au maintien dans le périplasma d'une force ionique minimale nécessaire au fonctionnement de EnvZ mais que la régulation de la balance des porines est indépendante de la présence d'OPG, et donc que EnvZ ne perçoit donc pas les variations de l'osmolarité par leur intermédiaire.

D'autre part, Ebel et coll. (1997) ont montré que l'expression des gènes *cps* (qui gouvernent la polymérisation, le transport et la modification de l'acide colanique) est augmentée 38 fois dans un contexte Opg^- . Cet effet est strictement dépendant de la présence des protéines régulatrices RcsA, RcsB, RcsC (voir paragraphe I.D.2.). De plus, l'expression des gènes *cps* est, dans un contexte Opg^- , indépendante de l'osmolarité, alors que dans un contexte sauvage, un stress hyperosmotique augmente l'expression des gènes *cps*. Les auteurs proposent que la quantité périplasmique d'OPG constitue le signal auquel RcsC (protéine capteur du couple capteur/régulateur RcsC/RcsB) répond aux variations d'osmolarité. Cependant, là encore, l'effet de la mutation Opg^- pourrait être indirect, et l'altération des propriétés de l'enveloppe pourrait perturber le fonctionnement du système de transduction RcsC/RcsB, sans que les OPG eux-mêmes soient impliqués dans ce système de transduction.

C. *E. Chrysanthemi*, BACTERIE MODELE POUR L'ETUDE DES OPG

E. chrysanthemi appartient, avec *E. carotovora* et *E. atroseptica*, à la famille des *Erwinia* pectinolytiques (Dye, 1969), que l'on trouve couramment dans le sol ou associées aux plantes. L'infection par les *Erwinia* pectinolytiques aboutit généralement à une macération et un pourrissement des tissus parenchymateux des organes de réserves (tubercules, fruits...). Les symptômes sur la plante entière sont par contre plus variés, et sont déterminés par les conditions environnementales : une pourriture molle des tiges et des feuilles à tendance à survenir sous des conditions humides, alors que le flétrissement et le dessèchement de la plante prédominent sous des conditions sèches (Perembelon et Kelman, 1980). Le groupe des *Erwinia* pectinolytiques provoque la pourriture molle de nombreuses plantes, aussi bien monocotylédones que dicotylédones, telles que maïs, riz, pomme de terre, carotte, navet, courge, concombre, melon, et de plantes ornementales telles que chrysanthème, saintpaulia, dalhia, anémone, cyclamen, philodendron.

Ces symptômes résultent de la désorganisation de la paroi végétale, causée par une batterie d'enzymes, en particulier des pectinases, mais aussi des cellulases et des protéases. Ces enzymes sont excrétées par les bactéries, ce qui facilite la pénétration du pathogène et la colonisation du tissu végétal. D'autres facteurs, en particulier la compétition pour le fer, interviennent également dans le processus d'infection.

1. LA PECTINOLYSE

La dégradation de la pectine est l'élément principal du pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* et les enzymes pectinolytiques (pectate-lyases) jouent un rôle prédominant dans la macération du tissu végétal, les pectate-lyases purifiées pouvant provoquer à elles seules les symptômes de la pourriture molle (Collmer et Keen, 1986 ; Barras et coll., 1994).

a) Les enzymes impliquées

La structure générale de la pectine consiste en des chaînes linéaires de résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4, partiellement méthylestérifiées et acétylestérifiées, entremêlées de rhamnogalacturonanes hautement ramifiés contenant des sucres neutres tels que xylose, arabinose et galactose. La complexité de la pectine se reflète au travers de la multiplicité des

enzymes produites par les bactéries pectinolytiques, comme l'a montré l'analyse de l'équipement enzymatique de différentes souches d'*E. chrysanthemi* (Figure 7 page 46).

E. chrysanthemi 3937 produit une endo-pectine-lyase, PnlA (Tsuyumu et Chatterjee, 1984) ; une exo-polygalacturonase hydrolytique, PehX (He et Collmer, 1990 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996) ; une exo-pectate-lyase, PelX (Brooks et coll., 1990 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996) ; 5 endo-pectate-lyases majeures, PelA, B, C, D et E (Tardy et coll., 1997) ; au moins 5 endo-pectate-lyases secondaires dont PelL, Z et I (Alfano et coll., 1995 ; Lojkowska et coll., 1995 ; Pissavin et coll., 1996 ; Shevchik et coll., 1997a). L'activité des pectate-lyases est facilitée par l'action d'au moins une pectine-acétyl estérase, PaeY (Shevchik et coll., 1997b), et les pectine-méthylestérases PemA, extracellulaire et active sur la pectine (Laurent et coll., 1993) et PemB, lipoprotéine de la membrane externe active préférentiellement sur des oligomères (Shevchik et coll., 1996). Enfin, une oligogalacturonate-lyase, Ogl, clive les oligogalacturonides résultant de l'action des pectinases en galacturonate et DKI (5-céto-4-désoxyuronate). Le monomère produit majoritairement est le DKI, et seule une faible quantité de galacturonate résulte de la dégradation de la pectine (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996).

E. chrysanthemi n'est pas seulement capable de dégrader la pectine, mais l'utilise aussi comme source de carbone et d'énergie. Le DKI et le galacturonate sont dégradés, par 2 voies indépendantes, en 2-céto-3-désoxygluconate, ou KDG, clivé ultérieurement en pyruvate et 3-phosphoglyceraldéhyde qui rejoignent le métabolisme général de la cellule (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996).

b) Les facteurs influençant la production de pectinases

Les gènes codant les pectate-lyases majeures sont organisés en 2 ensembles distincts regroupant *pelB* et *pelC* d'une part et *pelA*, *pelE*, *pelD* d'autre part (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1989), chaque gène étant cependant transcrit de manière indépendante (Kotoujansky, 1987). L'expression de ces gènes est induite par les produits de dégradation de la pectine (Condemine et coll., 1986) et par des facteurs d'origine végétale (Bourson et coll., 1993 ; Masclaux et coll., 1996). L'expression des gènes *pel* est induite en phase stationnaire, est soumise à la répression catabolique et est réprimée dans des conditions de carence en azote ou haute température (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992).

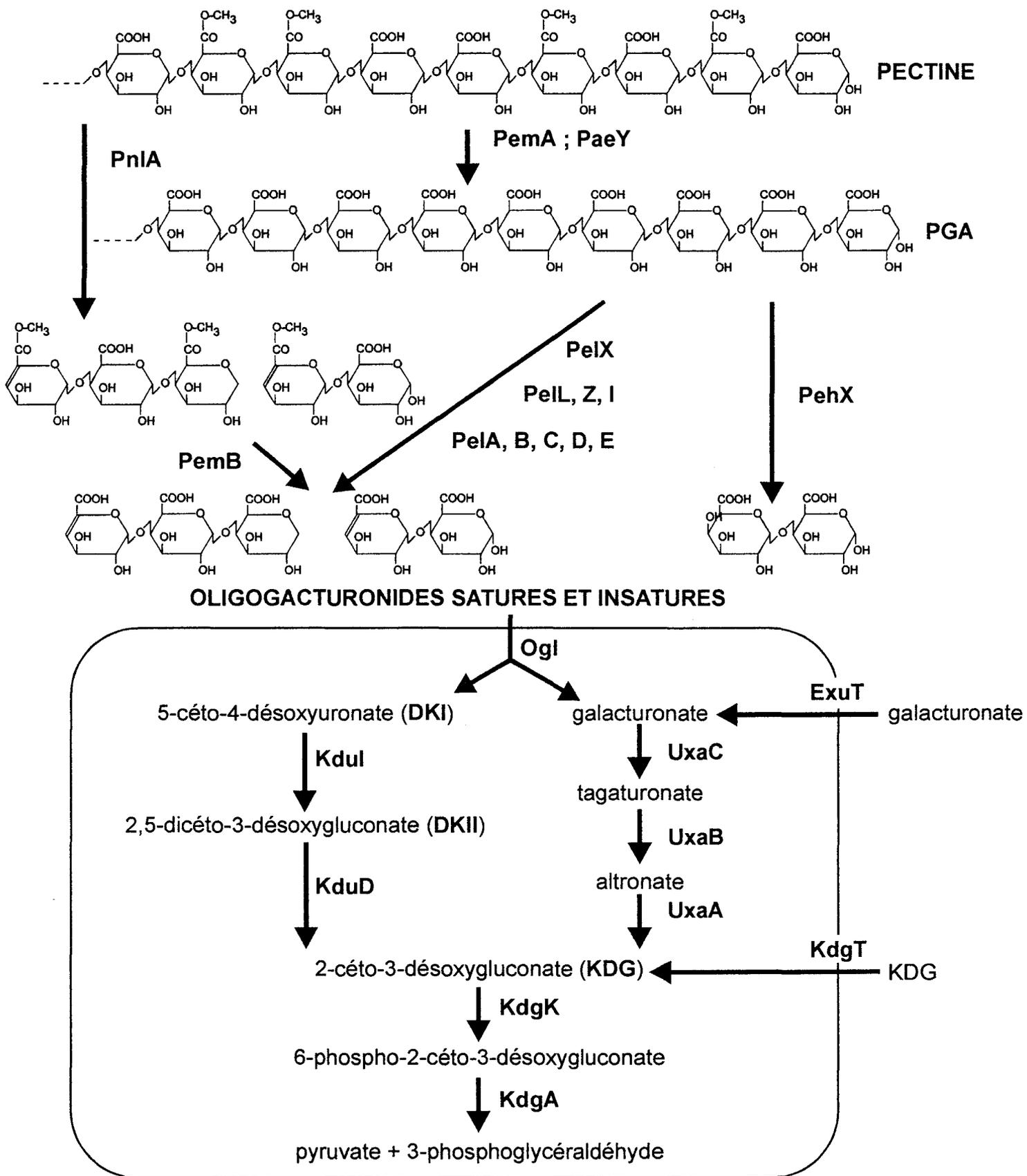


Figure 7 : Catabolisme de la pectine chez *E. chrysanthemi* (d'après Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). PelX et PemB, bien qu'apparaissant extracellulaires sur ce schéma, sont respectivement périplasmique et membranaire.

D'autres conditions de croissance n'affectent que l'expression de certains gènes *pel* : l'expression de *pelA*, *pelD* et *pelE* est modulée par l'anaérobiose (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992), l'expression de *pelB*, *pelC* et *pelE* est stimulée en condition de carence martiale (Sauvage et Expert, 1994) ; l'expression de *pelE* est augmentée et celle de *pelD* diminuée à haute osmolarité (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992).

Les différentes pectate-lyases diffèrent par leur localisation *in planta* (Temsha et coll., 1991), la nature des oligogalacturonides produits (Preston et coll., 1992), leur capacité à macérer le tissu végétal (Barras et coll., 1987), leur importance dans la pathogénicité (Ried et Collmer, 1988 ; Boccara et coll., 1988 ; Beaulieu et coll., 1993), leur importance en fonction de la nature du végétal infecté (Boccara et coll., 1991 ; Beaulieu et coll., 1993 ; Lojkowska et coll., 1993), leur cinétique d'expression *in planta* (Masclaux et coll., 1996), leur niveau d'expression basal et l'amplitude de leur inductibilité par les signaux environnementaux (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992).

La structure de la pectine variant en fonction des végétaux, des tissus, et des compartiments cellulaires, il apparaît que la capacité d'*E. chrysanthemi* à infecter un large spectre d'hôte résulte de la coopération d'un arsenal d'enzymes pectinolytiques plus ou moins spécialisées agissant de manière coordonnée.

c) Maturation et sécrétion des pectinases

Hormis *PnlA*, *PelX*, *PemB* et *Ogl*, toutes les pectinases caractérisées sont excrétées dans le milieu extérieur *via* un système de sécrétion de type II, le système *out*. Le locus *out* consiste en 15 gènes organisés en 5 opérons : *outS*, *outB*, *outT*, *outCDEFGHIJKLM* et *outO* (Salmond, 1994). Un modèle de fonctionnement du système *Out*, proposé par Shevchik et coll. (1997), est représenté Figure 8 page 48.

Une mutation *dsbA* affectant l'excrétion des pectate-lyases majeures, il apparaît qu'une mise en conformation correcte de ces protéines dans le périplasme, qui empêche leur protéolyse, soit indispensable à leur excrétion (Shevchik et coll., 1995).

La synthèse et l'excrétion des pectinases sont fortement corégulées. En effet, *outT* et *outC* appartiennent au régulon *kdgR*, *outC* est régulé par *PecS* (voir paragraphe III.A.4.a.). De plus, les conditions environnementales affectant la production des pectate-lyases (température, carence en azote, osmolarité, anaérobiose, phase de croissance) modulent également l'expression des gènes *out* (Condemine Robert-Baudouy, 1995).

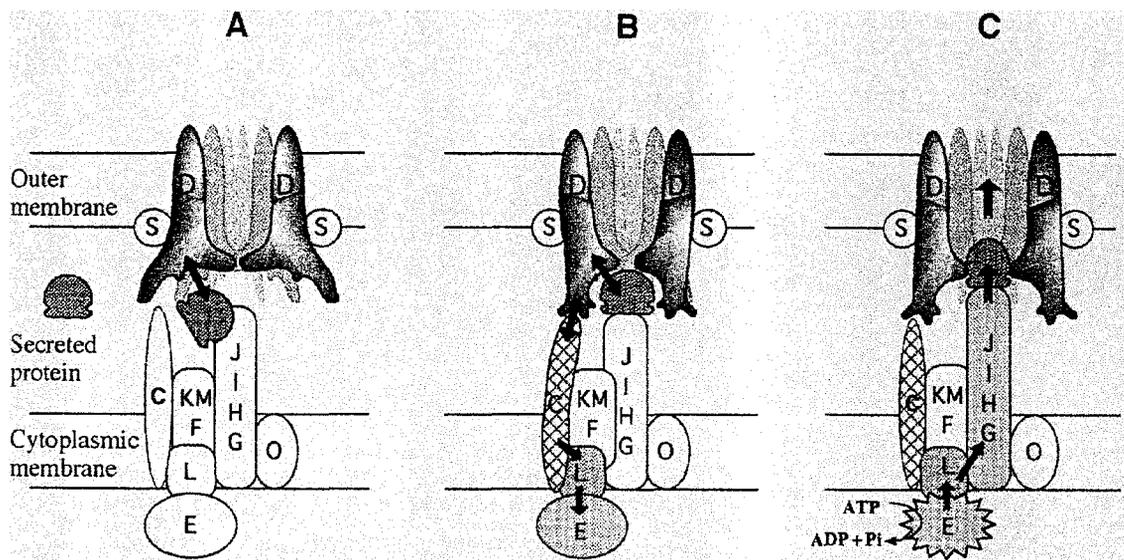


Figure 8 : Modèle de fonctionnement du système Out d'*E. chrysanthemi* (d'après Shevchik et coll., 1997). **A)** Les multimères de OutD, probablement associés à OutS qui est nécessaire à la stabilisation de OutD ou à son insertion dans la membrane externe, forment un canal. La région amino-terminale de OutD, périplasmique, est susceptible d'interagir avec les protéines sécrétées. **B)** L'interaction de OutD avec la protéine sécrétée induit un changement de conformation de OutD, transduit vers OutL et OutE, protéines de la membrane interne, par une des protéines du système possédant un grand domaine périplasmique (OutC, K ou M). **C)** OutE, probablement une ATPase, peut alors fournir l'énergie nécessaire au système pour pousser le protéine sécrétée à travers le pore formé par outD.

d) Les systèmes de régulation

Une représentation schématique des principaux systèmes de régulation de la pectinolyse est présentée Figure 9 page 51.

(1) Régulation par KdgR

Tous les gènes impliqués dans la pectinolyse, l'excrétion des pectinases et le catabolisme des oligogalacturonides (hormis *exuT*, *uxaA*, *uxaB*, *uxaC*) sont induits en présence de pectine, de PGA ou de galacturonate (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). Les inducteurs vrais sont en fait le KDG, le DKI et le DKII, produits initialement grâce au niveau d'expression basal des pectinases (Chatterjee et coll., 1985 ; Condemine et coll., 1986 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1987 ; Condemine et Robert-Baudouy, 1991). Dans la plupart des cas, cette régulation est directement médiée par un répresseur, KdgR (Condemine et Robert-Baudouy, 1987 ; Reverchon et coll., 1990), dont l'inactivation par sa liaison au KDG a été démontrée (Nasser et coll., 1991, 1992, 1994). Dans le cas de *kduD*, *pemA*, *kdgA* et *outC*, aucune interaction directe entre KdgR et les régions régulatrices n'a pu être mise en évidence (Nasser et coll., 1994), suggérant un mécanisme de régulation plus complexe faisant intervenir un(des) cofacteur(s) ou une cascade de régulation. Un tel mécanisme a été mis en évidence dans le cas de *outC*, où la régulation par KdgR requiert OutT, qui serait un activateur transcriptionnel, lui-même régulé par KdgR (Condemine et coll., 1992 ; Condemine et Robert-Baudouy, 1995).

KdgR est en fait un régulateur plus général, non réduit à la régulation de la pectinolyse. En effet, des gènes *pgi* (PGA inducible) semblant ne pas être impliqués dans le métabolisme du PGA ont été identifiés (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1989 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). KdgR pourrait être un régulateur général des facteurs de virulence, puisque certains de ces mutants *pgi* ont une virulence réduite.

(2) Régulation par PecS/PecM

PecS régule négativement l'expression des gènes *pel*, *out*, *ogl* et *celZ* (codant la cellulase majeure EGZ, voir paragraphe III.B.) ainsi que la production d'un pigment bleu extracellulaire, probablement impliqué dans la réponse bactérienne aux défenses des plantes hôtes (Reverchon et coll., 1994). Le locus *pecS* est constitué de deux gènes transcrits de manière divergente, *pecS* et *pecM* (Reverchon et coll., 1994). PecS est un répresseur autorégulé, dont l'affinité pour les régions régulatrices des différents gènes qu'il contrôle est

directement corrélée à l'intensité de la régulation qu'il exerce (Praillet et coll., 1996). PecM est une protéine membranaire, dont l'expression est régulée par PecS et qui est nécessaire à l'activité de PecS (Praillet et coll., 1997). La modification de PecS par PecM conduirait à une augmentation de l'affinité de PecS pour ses sites de fixation à l'ADN. PecS et PecM formerait ainsi un couple capteur-régulateur atypique, puisque l'activation de PecS par PecM n'est pas médiée par la phosphorylation. Le(s) signal(aux) extracellulaire(s) modulant l'activité de PecS et de PecM est inconnue, mais il pourrait s'agir de composés phénoliques d'origine végétale ou de composés produits lors des réactions de défense, comme par exemple des phytoalexines.

(3) Régulation par PecT

PecT réprime l'expression des gènes *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pell*, active celle de *pelB* et s'autorégule négativement (Surgey et coll., 1996 ; Castillo et Reverchon, 1997). PecT appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR et serait également impliqué dans la régulation de la biosynthèse d'EPS et de la motilité. Enfin, PecT pourrait interagir avec Lrp (leucine-responsive protein, régulateur général du métabolisme) pour le contrôle de certains gènes. Le signal impliqué dans la régulation par PecT est à l'heure actuelle inconnu.

(4) Régulation par CRP

La production de pectate-lyases est soumise à la répression catabolique, médiée par l'AMP cyclique, en présence de glucose ou des produits de dégradation de la pectine (Hubbard et coll., 1978 ; Tsuyumu, 1979). De plus, le spectre des pectinases produites dépend fortement de la source de carbone présente dans le milieu de culture, suggérant que les différents gènes de structure des pectinases sont différemment sensibles à la répression catabolique (Shevchik et coll., 1992). CRP (cyclic AMP receptor protein) est le principal activateur des gènes impliqués dans la pectinolyse (Reverchon et coll., 1997) : l'expression des gènes *pemA*, *pelB*, *C*, *D*, *E*, *ogl*, *kduI* et *kdgT* est directement activée par CRP ; par contre, l'expression de *pelA* est contrôlée négativement par un mécanisme indirect (Nasser et coll., 1997). Selon les gènes, l'effet antagoniste de CRP et de KdgR résulterait soit d'une compétition entre ces deux régulateurs, soit d'une compétition entre le répresseur et l'ARN-polymérase, pour l'occupation d'une même région d'ADN au niveau des gènes cibles (Nasser et coll., 1997).

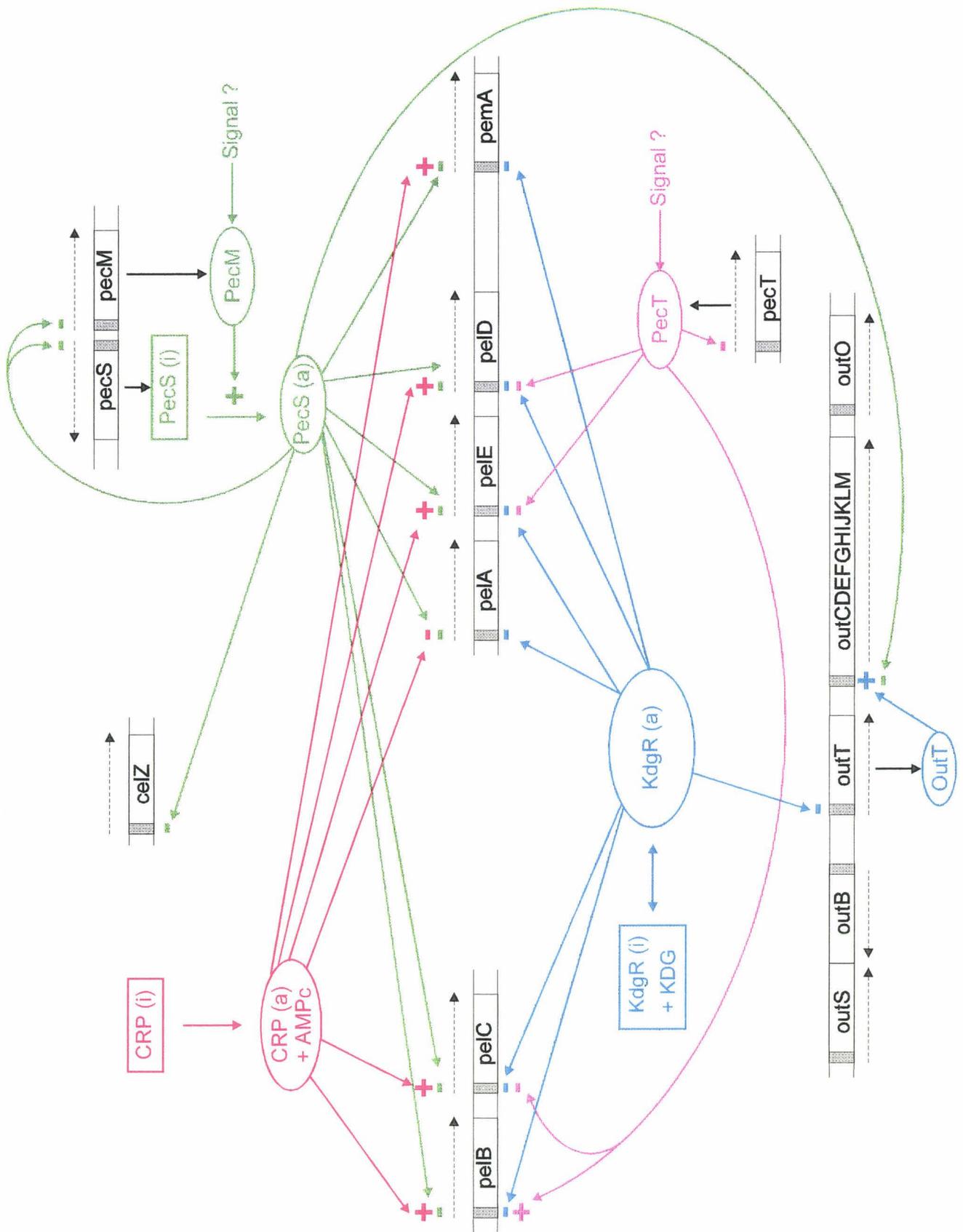


Figure 9 : Régulation de l'expression des gènes codant les principales pectinases, le système Out et la cellulase EGZ. Les protéines régulatrices et leurs cibles sont représentés. (i) signifie que la protéine est inactive (KdgR, CRP) ou de faible affinité pour son site de fixation à l'ADN (PecS). (a) signifie que la protéine est active (KdgR, CRP) ou de haute affinité pour son site de fixation à l'ADN (PecS).

Dans le cas de *pelB*, *pelC*, *pelD* et *pelE*, l'activation par CRP a lieu même quand KdgR exerce son action (Reverchon et coll., 1997), ce qui permet l'expression d'un niveau basal de pectate-lyases nécessaire au processus d'induction.

(5) Autres systèmes de régulation

La multiplicité des systèmes de régulation permet certainement de réguler très finement la production des pectinases. A ces différents systèmes se surimposent d'ailleurs les processus de régulation en fonction de la phase de croissance et des conditions environnementales (température, osmolarité, carence en azote ou en fer, anaérobiose), qui n'ont pas été clairement élucidés mais font vraisemblablement intervenir des mécanismes de régulation plus généraux (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). Enfin, il existe des systèmes de régulation beaucoup plus spécifiques. Par exemple, chez *E. carotovora*, PehR est un régulateur spécifique de *pehA* (Saarilahti et coll., 1992) et RdgA/RdgB régulent l'expression de *pnlA* (Liu et coll., 1994). Chez *E. chrysanthemi*, ExuR régulent l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme du galacturonate, *exuT* et *uxaCBA* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1987)

2. LA CELLULOLYSE

E. chrysanthemi 3937 produit deux cellulases, EGY et EGZ (endo- β 1,4-glucanase Y et Z), codées respectivement par *celY* et *celZ* (Aymeric et coll., 1988 ; Guiseppi et coll., 1991) mais qui ne jouent qu'un rôle mineur dans la virulence (Boccaro et coll., 1994). EGZ est une protéine excrétée via le système Out (Andro et coll., 1984 ; Thurn et Chatterjee, 1985 ; Ji et coll., 1987 ; Py et coll., 1991) et représente 97% de l'activité globale, EGY est une protéine périplasmique (Boyer et coll., 1987 ; Guiseppi et coll., 1991). La dégradation de la cellulose conduit à la formation de cellobiose, entrant alors dans la cellule par un système de phosphotransférase (Barras et coll., 1989). L'expression des cellulases est induite en phase stationnaire (Aymeric et coll., 1988) et *celZ* est régulé négativement par PecM/PecS (Reverchon et coll., 1994). Une mise en conformation correcte de CelZ, en particulier par l'établissement d'un pont disulfure, est indispensable à son excrétion *via* le système Out (Py et coll., 1993 ; Bortoli-German et coll., 1994).

3. LES PROTEASES

La production d'exoprotéases a été mise en évidence dans plusieurs souches d'*E. chrysanthemi* (Barras et coll., 1986 ; Wandersman et coll., 1987) mais celles-ci ne semblent pas indispensables à la virulence (Dahler et coll., 1990). Le mécanisme d'excrétion des protéases a été particulièrement bien étudié chez *E. chrysanthemi* AB374, qui produit quatre métalloprotéases, PtrA, B, D et G (Wandersman et coll., 1987 ; Ghigo et Wandersman, 1992). Ces protéases sont excrétées par un système de type I comprenant PtrD, le transporteur de la membrane interne de type ABC ; PtrE, protéine de la membrane interne possédant un grand domaine périplasmique appartenant à la famille MFP (membrane fusion protein) et PtrF, protéine de la membrane externe spécifique à ce transport (Létoffé et coll., 1990 ; Delepelaire et Wandersman, 1991).

Les protéases ne possèdent pas de peptide signal et sont excrétées, probablement non conformées (Delepelaire et Wandersman, 1998), en une seule étape, sans intermédiaire périplasmique. Dans les systèmes de sécrétion de type I, le transporteur ABC reconnaît son substrat par un signal carboxy-terminal (Delepelaire et Wandersman, 1990 ; Ghigo et Wandersman, 1994), ce qui déclenche une association séquentielle de la MFP et de la protéine de la membrane externe en un complexe fonctionnel (Delepelaire, 1994 ; Binet et Wandersman, 1995 ; Létoffé et coll., 1996). Ainsi, il existe des interactions spécifiques entre le substrat et le transporteur ABC, entre la protéine de la membrane externe et la MPF (Binet et Wandersman, 1995) ; entre le transporteur ABC et la MPF (Akatsuka et coll., 1997 ; Hwang et coll., 1997).

4. L'ASSIMILATION DU FER

L'assimilation du fer est nécessaire au développement systémique de l'infection de *Saintpaulia* par *E. chrysanthemi* (Enard et coll., 1988). De fait, la concentration en fer des fluides intercellulaires des feuilles de *Saintpaulia* est suffisamment basse pour restreindre la croissance de mutants déficients dans l'assimilation du fer durant les premières phases de l'infection (Enard et coll., 1991). En conditions de carence martiale, *E. chrysanthemi* 3937 produit deux sidérophores, la chrysobactine, N-[N²-(2,3-dihydroxybenzoyl)-D-lysyl]-L-sérine (Persmark et coll., 1989) et l'achromobactine, de structure inconnue (Mahé et coll., 1995).

Le complexe fer-achromobactine est transporté *via* une ferrisidérophore-perméase de la famille des transporteurs de type ABC, CbrABCD, opérationnelle en présence de fer et impliquée dans l'homéostasie (Mahé et coll., 1995). Par contre, l'opéron *fct cbsCEBA* (codant

le récepteur du complexe fer-chrysobactine et les gènes impliqués dans les premières étapes de la biosynthèse de la chrysobactine) n'est exprimé que dans des conditions de carence martiale. Bien que des mutants *cbu* (chrysobactin uptake) et *cbx* (chrysobactin excretion) aient été obtenus (Enard et coll., 1988), les mécanismes de l'excrétion de la chrysobactine et du transport du complexe fer-chrysobactine à travers l'enveloppe n'ont pas été caractérisés. La chrysobactine est produite *in planta* (Neema et coll., 1993) et l'expression de l'opéron *fct cbsCEBA* est induite lors d'infections de feuilles de saintpaulia et varie au cours du développement de l'infection (Masclaux et Expert, 1995). D'autre part, l'infection par un mutant *fct* conduit au développement d'un front de nécrose corrélé à une baisse de la viabilité des bactéries (Masclaux et Expert, 1995). Comme les fluides végétaux extracellulaires sont perçus comme un milieu carencé en fer et que certaines fonctions impliquées dans la virulence, comme la synthèse de certaines pectate-lyases (Sauvage et Expert, 1994), sont régulées par le fer, celui-ci pourrait moduler de manière coordonnée l'expression de certains facteurs de virulence à certains stades de l'infection (Masclaux et Expert, 1995). La compétition pour le fer et (ou) la perturbation, par la chrysobactine, de la biosynthèse des composés phénoliques végétaux, pourraient également perturber les réactions de défense de la plante (Masclaux et Expert, 1995).

5. AUTRES INTERVENANTS POSSIBLES DANS LE POUVOIR PATHOGENE

E. chrysanthemi produit d'autres enzymes de dégradation comme des nucléases (Moulard et coll., 1993), une phospholipase (Keen et coll., 1992) et une xylanase (Keen et coll., 1996) extracellulaires mais ces enzymes ne semblent pas nécessaires au pouvoir pathogène.

Des mutants *rvi* (reduced virulence) ont été isolés chez *E. carotovora* (Hinton et coll., 1989). Ces mutants présentent un pouvoir pathogène diminué, mais ne sont affectés ni dans la synthèse et l'excrétion des enzymes de dégradation de la paroi végétale, ni dans le système d'assimilation du fer. Il existe donc vraisemblablement d'autres facteurs encore non identifiés.

Une mutation annulant la synthèse de « l'harpine » HrpN, protéine de surface capable à elle seule de provoquer une réaction d'hypersensibilité, abolit celle-ci chez le tabac et réduit la capacité à induire une infection de feuilles d'endive, mais ne réduit pas la taille des lésions en cas de réussite de l'infection (Bauer et coll., 1994, 1995). D'autre part, Schoonejans et

coll. (1987) ont isolé, grâce à leur résistance à des bactériocines ou à des phages (ϕ EC2 ou Mu), des mutants d'*E. chrysanthemi* ayant un LPS modifié. Des essais d'infection de saintpaulia ont montré que des mutants ayant perdu le coeur oligosaccharidique du LPS, bien qu'excrétant des taux normaux de pectate-lyases et de cellulases, ont également perdu leur virulence. De plus, certains de ces mutants peuvent induire une réaction de défense systémique contre une infection ultérieure par des bactéries sauvages. Si les éléments intervenant dans l'interaction bactérie- plante restent à déterminer, ces résultats montrent d'une part l'importance des mécanismes d'interaction de surface entre la bactérie et la plante hôte, d'autre part l'existence de mécanismes évitant l'induction par *E. chrysanthemi* des réactions de défense de la plante.

D. OBJECTIFS

E. chrysanthemi constitue, *a priori*, un excellent modèle d'étude des fonctions et de la biosynthèse des OPG linéaires branchés. D'une part, *E. chrysanthemi*, qui est comme *E. coli* une entérobactérie, présente un certain nombre d'avantages pour les analyses génétiques des interactions bactéries-plantes par rapport à d'autres bactéries phytopathogènes étudiées. En effet, de nombreuses techniques mises au point chez *E. coli* ont été adaptées à *E. chrysanthemi* (mutagénèse par insertion de transposon, transformation, transduction, conjugaison, génétique inverse) et la proximité de ces deux espèces d'une part permet la génétique intergénérique, d'autre part permet de tirer profit de la relative conservation de l'organisation du génome. Enfin, l'étude de la virulence (et des autres phénotypes associés aux mutations *Opg*⁻) des mutants incapables de substituer les OPG serait facilitée chez *E. chrysanthemi*, puisqu'il n'existe qu'un seul type de substituant, le succinate, qui est en outre le substituant le plus répandu.

Les objectifs initiaux de ce travail étaient donc premièrement de cloner les gènes de biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi*, puis de réaliser des mutants afin de pouvoir estimer l'impact de ces mutations dans la pathogénicité, globalement mais aussi plus finement, en étudiant l'impact de ces mutations sur l'excrétion des enzymes de dégradation de la paroi végétale. Deuxièmement, de déterminer la séquence de ces gènes afin de faciliter l'analyse des domaines des protéines impliquées dans la biosynthèse des OPG par comparaison de leur séquence chez plusieurs espèces. Enfin, d'étudier la régulation *in planta* de la synthèse des OPG ainsi que la régulation des gènes de biosynthèse.

L'étude de l'expression des gènes de biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* ayant révélée une possible contradiction avec les résultats obtenus chez *E. coli*, la régulation de l'expression de *mdoGH* a été réexaminée. Enfin, ce travail ayant abouti à l'obtention d'un crible *a priori* puissant, des mutations affectant l'expression de *mdoGH* ont été recherchées dans la perspective de perturber la régulation de la synthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* et d'en étudier l'impact sur la pathogénicité.

II. MATERIELS ET METHODES

A. SOUCHES ET MILIEUX

1. GENOTYPE DES SOUCHES UTILISEES

Les souches d'*E. coli* K12 utilisées sont décrites dans le Tableau 1 page 59. Les souches d'*E. chrysanthemi* utilisées sont décrites dans le Tableau 2 page 60.

2. MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées avec agitation à 37°C ou à 30°C (lorsque tout ou partie de l'opéron *mdoGH* est exprimé à partir de plasmides). Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C.

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. La composition des différents milieux est décrite ci-dessous :

- Milieu Luria-Bertani ou LB (Miller, 1992). L'omission du NaCl permet l'obtention d'un milieu de basse osmolarité (100 mosM).

- Milieu 2YT, utilisé pour la production de phage M13 simple brin : bactotryptone (16 g/l), extrait de levure (10 g/l), NaCl (10 g/l).

- Milieu minimum 63 (Miller, 1992) complété par les métabolites nécessaires (acides aminés et bases azotées 40 mg/ml, thiamine 2 mg/ml, sources de carbone 0,2% sauf PGA 0,4%).

- Le milieu 63 carencé en fer est préparé par passage du milieu sur colonne CHELEX 100 (BIO-RAD). Toute la verrerie utilisée est traitée dans ce cas à l'acide nitrique 10% pendant 4 heures.

- Milieu de basse osmolarité (LOS ; Kennedy, 1982) : K_2HPO_4 (1 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (1,5mM), $MgCl_2$ (0,08 mM), $FeSO_4$ (0,5mg/ml), thiamine (2 mg/ml), hydrolysate de caséine (4 g/l ; casamino acids vitamin free, Difco laboratories). Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris (1M) et complété si nécessaire. L'osmolarité de ce milieu est de 66 mosM et peut être augmentée par l'addition de NaCl (4M).

- Milieu Bas Phosphate : Tris HCl (120 mM), NaCl (90 mM), KCl (40 mM), NH₄Cl (21 mM), CaCl₂ (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), Na₂SO₄ (25 μM), KH₂PO₄ (0,5 mM), bacto-peptone (0,25%), pH 7,4. Ce milieu carencé en phosphate sert de milieu de culture pour favoriser la perte de matériel plasmidique, et est complétement par une source de carbone et les acides aminés adéquats (Torriani, 1968).

- Milieu Mac Conkey (Difco Laboratories) complétement par différents sucres comme source de carbone (1%).

- Pour la détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice), les bactéries sont étalées sur des boîtes de milieu LB gélosé contenant des concentrations variables de sels biliaires (Bile salts N°3, Difco laboratories).

- L'extrait de chrysanthème est préparé par autoclavage des feuilles en milieu liquide (10 g de feuilles dans 100 ml de milieu 63). L'extrait de pomme de terre est préparé dans une presse de French à partir de tubercules épluchés mixés au robot ménager. L'extrait obtenu est stérilisé par filtration (filtre Millipore 0,22 μm).

Tous ces milieux peuvent être solidifiés par de l'agar à 15 g/l. Les antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : ampicilline, 50 μg/ml pour *E. coli*, 10 μg/ml pour *E. chrysanthemi* ; kanamycine, 50 μg/ml pour *E. coli*, 10 μg/ml pour *E. chrysanthemi* ; tétracycline 25 μg/ml pour *E. coli*, 5 μg/ml pour *E. chrysanthemi*.

Les souches sont conservées dans du glycérol 15% à -20°C et -80°C.

3. PLASMIDES UTILISES

Les plasmides utilisés sont décrits dans le Tableau 3 page 61.

B. TECHNIQUES GENETIQUES

1. TRANSDUCTION

Les transductions utilisant le phage P1vir ont été réalisées d'après Miller (1992). Les transductions utilisant le phage ΦEC2 ont été réalisées d'après Résibois et coll. (1984).

Tableau 1 : Génotypes des souches d'*E. coli* K12 utilisées.

Souches	Génotype	Source / Référence
A324	F ⁻ , <i>pro</i> , <i>lacl</i> , <i>rpsL</i>	collection du laboratoire
BW6156	Hfr (P4X) (PO3), <i>metB1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>zje2005::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
BW6164	Hfr (Ra-2) (PO48), <i>thr-43::Tn10</i> , <i>malB28</i> , <i>glnV42</i> , <i>sfa-4</i>	Singer et coll., 1989
BW6165	Hfr (P801) (PO120), <i>argE86::Tn10</i> , <i>ara-41</i> , <i>lacY1</i> , <i>mtlA2</i> , <i>xylA7</i>	Singer et coll., 1989
BW6166	Hfr ((J4) (PO18), <i>thi-1</i> , <i>malB16</i> , <i>glnV44</i> , <i>zhf-721::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
CAG12019	F ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>zjg-920::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
CAG12073	F ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>cycA30::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
CAG18427	F ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>zje2241::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
CAG18429	F ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>zjh-606::Tn10</i>	Singer et coll., 1989
JC7623	<i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , Δ (<i>gpt-proA</i>)62, <i>hisG4</i> , <i>argE3</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>kdgK51</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recB21</i> , <i>recC22</i> , <i>sbcB15</i> , <i>tsx33</i> , <i>rpsL31</i> , <i>supE44</i> , <i>rac</i>	Cohen A. et Clark A.J.
JM83	Δ (<i>lac-pro</i>), <i>thi</i> , <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)	Vieira et Messing, 1982
MC4100	F ⁻ , <i>thiA</i> , Δ (<i>lac</i>)U169, <i>araD139</i> , Δ <i>bet</i> , <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flhD5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	collection du laboratoire
NFB216	JM83, <i>pyrC46</i> , <i>mdoH200::Tn10</i>	Lacroix et coll., 1989
NFB361	MC4100, <i>pyrC46</i>	collection du laboratoire
NFB702	JM83, <i>pyrC46</i> , <i>mdoG202::neo</i>	Lacroix et coll., 1991
NFB720	MC4100, <i>pyrC46</i> , <i>mdoH200::Tn10</i>	collection du laboratoire
NFB732	JM83, <i>mdoB214::Tn10</i>	collection du laboratoire
NFB1864	JM83, <i>mdoB214::Tn10</i> , <i>mdoC1::Tn5</i>	Lanfroy, 1997
NF1886	MC4100, <i>pyrC46</i> , <i>mdoH215::lacZ-Kan^R</i>	cette étude
NFB1908	MC4100, <i>pyrC46</i> , <i>mdoG215::uidA-Kan^R</i>	cette étude
NFB1909	MC4100, <i>pyrC46</i> , <i>mdoH213::uidA-Kan^R</i>	cette étude
NK6051	Hfr (H) (PO1), Δ (<i>gpt-lac</i>)5, <i>purK79::Tn10</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i>	Singer et coll., 1989
POP6476	F ⁻ , Δ (<i>lac</i>)U169, <i>araD139</i> , <i>rpsL</i> , <i>relA</i> , <i>thi</i> , <i>flbB</i> , <i>malF::Tn10</i>	Dassa E.

Tableau 2 : Génotypes des souches d'*E. chrysanthemi* utilisées.

Souches	Génotype	Source / Référence
A655	EC3937, <i>arg10</i> , <i>met1</i> , <i>outC::lacZ-Amp^R</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
A1383	EC3937, <i>ura-2</i> , <i>arg</i> , <i>pro</i> , <i>Str^R</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
A1703	EC3937, <i>pelE::lacZ-Cml^R</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
A1706	EC3937, <i>pelC::lacZ-Cml^R</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
A2575	EC3937, <i>epsG::lacZ-Tet^R</i>	Condemine G.
A3144	EC3937, <i>outS::Kan^R</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
EC3937	Sauvage	Kotoujansky et coll., 1982
NFB3500	EC3937, <i>opgG::uidA-Kan^R</i>	cette étude
NFB3501	EC3937, <i>opgH::uidA- Kan^R</i>	cette étude
NFB3502	A1703, <i>opgG::uidA- Kan^R</i>	cette étude
NFB3503	A1706, <i>opgG::uidA- Kan^R</i>	cette étude
NFB3504	A655, <i>opgG::uidA- Kan^R</i>	cette étude
NFB3511	A2575, <i>opgG::uidA- Kan^R</i>	cette étude

Tableau 3 : Caractéristiques des plasmides utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Source / Référence
pACYCK	Cml ^R , dérivé de pACYC184, <i>malK</i> ⁺ sous contrôle du promoteur <i>ptac</i>	Mourez et coll., 1997
pNF150	Kan ^R , séquence codante de la β -lactamase mature dans pYZ4	Loubens et coll., 1993
pNF239	Amp ^R , <i>mdoG</i> ⁺ <i>H</i> ⁺ dans pUC8	Lacroix et coll., 1989
pNF244	Amp ^R , <i>mdoC</i> ⁺ <i>mdoG</i> ⁺ <i>H</i> ⁺ dans pUC8	Lacroix et coll., 1989
pNF248	Amp ^R , <i>mdoG202::neo mdoH</i> ⁺ dans pUC8	Lacroix et coll., 1991
pNF252	Amp ^R , dérivé de pNM480, porteur d'une fusion traductionnelle <i>mdoH</i> ' <i>lacZ</i> , <i>mdoG</i> ⁺	Lacroix et coll., 1991
pNF555	Amp ^R , <i>mdoG</i> ⁺ dans pUC19	cette étude
pNTE	Amp ^R , dérivé de pUC8, <i>malE</i> ⁺ sous contrôle du promoteur <i>ptac</i>	Dassa E
pTAZFGQ	Amp ^R , dérivé de pTZ18R, <i>malF</i> ⁺ <i>malG</i> ⁺ sous contrôle du promoteur <i>ptac</i>	Mourez et coll., 1997
pUC8	Amp ^R	Vieira et Messing, 1982
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron et coll., 1985
pUC19	Amp ^R	Yanisch-Perron et coll., 1985
pUIDK11	Cml ^R , dérivé de pSU18 portant la cassette <i>uidA</i> -Kan ^R	Bardonnet et Blanco, 1992
pULB110	RP4::Mu3A, Amp ^R , Tet ^R , Kan ^S	Van Gijsegem et Toussaint, 1983
pYZ4	Kan ^R	Broome-Smith et coll., 1990

2. CONJUGAISON

a) Isolement de R-prime

Le plasmide pULB110, un dérivé RP4::mini-Mu sensible à la kanamycine (Van Gijsegem et coll., 1985), a été utilisé pour la mobilisation d'ADN chromosomique. Les deux bactéries à conjuguer, dont l'une contient le plasmide pULB110, sont cultivées durant la nuit dans du milieu LB. 200 µl de chaque culture sont étalés sur une boîte de milieu 63 et le mélange est incubé à 30°C pendant 5 h. Les bactéries sont resuspendues dans du milieu 63 puis étalées sur boîtes de milieu sélectif (milieu 63 + kanamycine).

b) Cartographie par conjugaison

Les conjugaisons ont été réalisées d'après Miller (1992). La cartographie a été réalisée par utilisation des souches Hfr décrites par Singer et coll. (1989) qui contiennent chacune une insertion de Tn10 approximativement 20 min au delà l'origine de transfert. Les conjugaisons sont interrompues 15 min après le transfert théorique du transposon.

3. TRANSFORMATION

Les souches d'*E. coli* ont été rendues compétentes par la méthode au chlorure de rubidium (Hanahan, 1983).

Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été transformées par électroporation d'après Sambrook et coll. (1989).

4. MUTAGENESE PAR LA N'-METHYL-N'-NITROSO-N-NITROSOGUANIDINE

La mutagenèse par la N'-méthyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine (NTG) est une application de la méthode décrite par Aldeberg et coll. (1965), de manière à obtenir en moyenne 10% de bactéries auxotrophes. Les bactéries sont cultivées en milieu LB jusqu'à une DO_{620nm} de 0,5 (5.10⁸ bactéries/ml). 1 ml de culture est lavé par du tampon TM (Tris 50mM, acide maléique 50 mM, MgSO₄ 8 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, pH 6) puis repris dans 1 ml de tampon TM. Après ajout de NTG à une concentration finale de 100 µg/ml, les bactéries sont incubées 30 min à 37°C. Les bactéries sont ensuite lavées puis resuspendues dans du milieu

LB, des collections indépendantes sont obtenues en cultivant des parties aliquotes de cette suspension en milieu LB jusqu'en phase stationnaire, ce qui permet de fixer les mutations.

5. RECOMBINAISON SUR LE CHROMOSOME

Chez *E. chrysanthemi* : le plasmide portant la construction à reporter sur le chromosome est introduit par électroporation dans une souche d'*E. chrysanthemi*. Les mutations sont intégrées dans le chromosome par échange d'allèles par des cultures successives en milieu bas phosphate additionné d'antibiotique (résistance introduite dans le gène muté), conditions dans lesquelles les dérivés du plasmide pBR322 sont très instables (Roeder et Collmer, 1985). La perte de la résistance plasmidique est ensuite testée.

Chez *E. coli* : le plasmide portant la construction à reporter sur le chromosome est linéarisé puis introduit par transformation dans la souche JC7623 (*recB recC sbcB*). La sélection s'effectue sur la résistance introduite dans le gène muté, la perte de la résistance plasmidique est ensuite testée.

C. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN

L'ADN plasmidique est préparé en grande quantité selon la méthode du « lysat clair » décrite par Clewell et Helinski (1979).

La préparation rapide d'ADN plasmidique est réalisée selon la méthode « d'ébullition » d'Holmes et Quigley (1981) suivie d'une purification au phénol et au chloroforme/alcool isoamylique (24/1).

L'ADN chromosomique est préparé selon la méthode de Davis et coll. (1980).

2. ENZYMES DE RESTRICTION ET DE MODIFICATION

Les endonucléases de restriction (Boehringer Mannheim, New England Biolabs, Pharmacia, Gibco BRL, Eurogentec, Appligene) ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Gibco BRL) a été utilisé dans le tampon fourni par Gibco BRL lorsque l'on privilégie son activité exonucléase 3'→5', et dans ce même tampon complété par les 4 dNTP à une concentration finale de 2 mM

lorsque l'on privilégie son activité ADN-polymérase 5'→3'. Dans les deux cas, l'incubation s'effectue à température ambiante pendant 20 min.

L'ADN-ligase du bactériophage T4 (Gibco BRL) a été utilisée dans le tampon fourni par Gibco BRL, pendant 1h à 37°C ou 12h à 4°C.

L'exonucléase III (Boehringer Mannheim) est une enzyme qui digère un brin de l'ADN double brin par son extrémité 3' lorsque celle-ci est rentrante ou franche, la quantité d'ADN digérée étant linéaire en fonction du temps. Elle est utilisée à 37°C dans du tampon Tris-HCL 66 mM, MgCl₂ 0,66 mM, β-mercaptoéthanol 1 mM, pH 7,6.

La nucléase S1 (Boehringer Mannheim) est utilisée à 37°C dans du tampon acétate de sodium 33 mM (pH 4,5), NaCl 50 mM, ZnSO₄ 0,03 mM.

3. ELECTROPHORESE

L'analyse des fragments de restriction est réalisée après électrophorèse en gel d'agarose (0,6 à 1% ; Gibco BRL) en présence de bromure d'éthidium (1 µg/ml) et de RNase (4 µg/ml ; Sigma), dans du tampon TBE (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM). Les fragments obtenus après délétions minimales par l'exonucléase III sont analysés après électrophorèse en gel de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 29/1) 10% et révélation au bromure d'éthidium.

Les fragments de restriction sont purifiés après migration en gel d'agarose dans du tampon TAE (Tris 200 mM, EDTA 5 mM, ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique glacial), selon la méthode de Silhavy et coll. (1984). Cette technique utilise l'exclusion de l'ADN de l'agarose par le phénol après congélation à -80°C.

4. DELETIONS PAR L'EXONUCLEASE III

Ce protocole est une adaptation de celui décrit par Henikoff (1984). Les plasmides à digérer (3 µg par temps d'arrêt) sont ouverts par deux enzymes de restriction, l'un donnant une extrémité 3' débordante, protégeant l'ADN de l'activité exonucléase III, l'autre donnant une extrémité 5' débordante, digérée par l'exonucléase III. L'ADN est repris dans le tampon de digestion puis, après 5 min de préincubation à 37°C, 10 unités d'exonucléase III sont ajoutées par µg d'ADN (dans un volume final égal à 4 fois le nombre de points d'arrêt). Le mélange est ensuite incubé à 37°C. A chaque temps d'arrêt de la réaction, 4 µl sont prélevés et introduits dans un tube de type Eppendorf contenant 12 µl d'eau et 2 µl de tampon de

digestion par la nucléase S1 10 fois concentré. L'exonucléase III est détruite par une incubation à 70°C pendant 10 min. Après refroidissement 10 min à température ambiante, 10 unités de nucléase S1 par µg d'ADN sont ajoutées et le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée par addition de 5 µl de tampon d'arrêt de la nucléase S1 (Tris-HCl 0,8 M (pH 8), EDTA 20 mM, MgCl₂ 80 mM). Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et les fragments obtenus purifiés. Les extrémités des fragments sont alors rendues franches par action du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* en absence puis en présence de dNTP.

Cette méthode permet d'obtenir des délétions d'environ 400 pb/min. Des délétions moins importantes (10 pb/min) sont obtenues en ajoutant du NaCl (90 mM final) dans le mélange réactionnel de l'exonucléase III.

5. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE

Le séquençage est réalisé suivant la méthode enzymatique de Sanger et coll. (1977) avec le kit « Sequenase version 2.0 » (USB Corporation). L'ADN simple brin est obtenu par dénaturation des plasmides par la soude 2 N 20 min à 37°C. La séparation des produits s'effectue par électrophorèse (45 mA) sur gel de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 19/1) 6% d'une longueur de 38 cm en présence d'urée (42%).

Le séquençage de l'opéron *opgGH* a été réalisé sur les 2 brins à partir d'une série de sous-clones portant des fragments chevauchants. Les sous-clonages ont été effectués dans les vecteurs pUC18 et pUC19 ou dans le vecteur pYZ4 lorsque des délétions par l'exonucléase III sont nécessaires. Le séquençage a été réalisé en utilisant les 2 oligo-désoxyribonucéotides universels (M13 primer et M13 reverse primer) comme amorce.

Le séquençage des points de fusion avec la β-lactamase a été réalisé avec l'amorce 5'-CCCACTCGTGCACCCAACT-3'.

6. HYBRIDATION MOLECULAIRE

Le marquage des sondes a été réalisé à l'aide du kit « DIG DNA labeling and detection » (Boehringer Mannheim).

Pour l'hybridation, 10 µg d'ADN (par puit) digérés par les endonucléases de restriction appropriées sont utilisés. Après électrophorèse en gel d'agarose 0,7% dans du tampon TBE, dépurination et dénaturation, l'ADN est transféré sur membrane de nylon

(Biotrans membrane N⁺ 0,45 µm ; ICN) par capillarité dans du tampon SSC (NaCl 3 M, citrate de Na 0,3 M, pH 7). La membrane est séchée et l'ADN est fixé par irradiation UV (0,4 J/cm²).

La préhybridation, l'hybridation et la révélation des bandes hybrides sont réalisées selon les recommandations du kit « DIG DNA labeling and detection » (Boehringer Mannheim).

D. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1. DOSAGE DU MDO

Le dosage est réalisé sur des bactéries cultivées une nuit en milieu LOS additionné de [2-³H] glycérol (0,45 mM, 296 Mbq/mmol). Pour l'analyse rapide du phénotype Opg des clones recombinants, des cultures de 1 ml sontensemencées directement à partir de colonies isolées prélevées sur boîte de milieu sélectif. Lorsque l'on désire analyser plus précisément le contenu en OPG, on effectue le dosage sur des cultures de 5 mlensemencées à partir de précultures en milieu LOS.

La méthode d'extraction utilisée (Kennedy, 1982) fait intervenir l'acide trichloroacétique (TCA) dans lequel le MDO reste soluble tandis que les macromolécules sont précipitées. A 1 volume de culture sont ajoutés 0,2 volume de TCA 30% et 0,2 volume de sérumalbumine bovine (BSA) à 5% (Sigma), la BSA servant d'entraîneur. Après centrifugation, on ajoute au surnageant 0,4 volume de charbon de bois (50 mg/ml) sur lequel le MDO s'adsorbe. Après deux rinçages à l'eau distillée, destinés à éliminer la radioactivité non spécifique, les molécules adsorbées sur le charbon sont extraites 2 fois par 0,2 volume de pyridine aqueuse 15%. La mesure de la radioactivité est effectuée par scintillation liquide.

A partir d'une extraction effectuée sur 5 ml de cultures, une fraction de l'extrait pyridine (1,5 ml) peut-être analysée sur colonne de filtration sur gel de Sephadex G-25 medium (Pharmacia). La colonne a une section de 2 cm² et 45 cm de hauteur. Elle est équilibrée par un tampon d'acétate d'ammonium 0,15 M dans une solution de propanol 7% (vol/vol). L'élution est réalisée avec le même tampon à la vitesse de 17 ml/h. Des fractions de 1,5 ml sont collectées et leur radioactivité déterminée.

Eventuellement, le contenu en sucre du MDO est analysé, après rassemblement et concentration des fractions contenant le MDO à l'aide d'un évaporateur rotatif, par la méthode colorimétrique utilisant le réactif à l'antrone (Spiro, 1966).

2. EXTRACTION RAPIDE DES OPG A L'ETHANOL

Cette technique est utilisée pour l'analyse rapide du phénotype Opg des clones recombinants d'*E. chrysanthemi*. Une culture bactérienne de 4 ml en phase stationnaire est centrifugée, lavée par 1 ml d'eau, puis resuspendue par 0,25 ml d'éthanol à 80%. La suspension est ensuite chauffée au bain marie à 70°C pendant 30 minutes. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 150000 g et le surnageant contenant les OPG est séché sous vide. Les OPG sont remis en solution dans 15 µl d'eau et 5 µl sont déposés sur couche mince (gel de silice 60 d'une épaisseur de 0,2 mm sur feuille d'aluminium ; Merck) pour analyse. La migration est effectuée dans le solvant éthanol / butanol / eau (5/5/4). Les glucanes sont révélés par pulvérisation d'orcinol sulfurique (orcinol 2 g/l dans de l'acide sulfurique 20%) et chauffage de la plaque à 110°C pendant quelques minutes.

3. PURIFICATION DES OPG

Pour la préparation d'OPG en grande quantité, la culture est arrêtée en phase stationnaire par centrifugation à 4°C 15 min à 5000 g. Le culot de cellules est repris dans un volume minimum d'eau puis traité au TCA 5% final pendant 30 minutes avec une forte agitation. Après centrifugation 10 min à 15000 g, le surnageant est neutralisé par addition de NH₄OH 10% et concentré jusqu'à un volume minimal à l'aide d'un évaporateur rotatif. Si la quantité de cellules est importante, le concentré est soumis à un traitement par le chloroforme/méthanol 2:1 (vol/vol).

Le matériel glucidique obtenu est repris dans un volume minimum de tampon d'élution (acide acétique 0,5%) et déposé sur une colonne de Biogel P4 (BIO-RAD ; longueur 68 cm, diamètre 1,5 cm, vitesse d'élution 15 ml/h, fractions de 2,5 ml). Les fractions renfermant les oligosaccharides sont recueillies et lyophilisées. Les oligosaccharides obtenus sont ensuite purifiés sur une colonne de Biogel P2 (BIO-RAD ; longueur 52 cm, diamètre 1,5 cm, vitesse d'élution 15 ml/h, éluant H₂O).

4. DETECTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyrannoside) est ajouté au milieu lorsque l'on veut distinguer les clones Lac⁺ des clones Lac⁻. Du X-GlucA (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) est ajouté au milieu lorsque l'on veut distinguer les clones UidA⁺ des clones UidA⁻.

Le test pectinase se réalise sur boîte de milieu minimum solide contenant du PGA (0,4%) et du glycérol (0,2%) comme deuxième source de carbone si nécessaire. Après 24 h de croissance à 30°C, les boîtes sont recouvertes par une solution aqueuse d'acétate de cuivre (10%) qui forme un complexe avec le PGA. Un halo translucide sur fond bleu correspondant à la zone de dégradation du PGA apparaît autour des colonies sécrétant des pectinases.

Le test cellulase (Teather et Wood, 1982) se réalise sur boîte de milieu minimum solide contenant de la carboxyméthylcellulose (0,2%), du glycérol (0,2%) et du MgSO₄ (7 mM). Après 24 h de croissance à 30°C, les boîtes sont recouvertes pendant 15 min par une solution aqueuse de rouge congo (1 mg/ml) qui se fixe sur la carboxyméthylcellulose. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages successifs de 5 à 10 min avec du NaCl 1 M. Les souches sécrétant des cellulases sont entourées d'un halo translucide sur fond rouge dû à l'hydrolyse de la cellulose du milieu.

Le test protéase se réalise sur boîte de milieu LB contenant du lait (1%). Après 24 h d'incubation à 30°C, les souches excrétrices de protéases sont détectables par la présence d'un halo transparent sur fond trouble autour des colonies, dû à l'hydrolyse des protéines du lait.

5. DOSAGE DES ACTIVITES β -GALACTOSIDASE ET β -GLUCURONIDASE

a) Dosage sur des extraits cellulaires

Les dosages sont réalisés sur des cultures en phase exponentielle de croissance (4 à 6.10^8 bactéries / ml de culture). Les cellules (50 ml de culture) sont centrifugées puis reprises dans 5 ml de tampon Z (Miller, 1992) pour les dosages de l'activité β -galactosidase, ou de milieu 63 pour les dosages de l'activité β -glucuronidase, en présence de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF, 1 mM). Les cellules sont ensuite cassées dans une presse de French à 20000 psi ($1,4.10^7$ Pa) ; l'extrait obtenu est ensuite centrifugé pour éliminer les débris cellulaires.

L'activité β -galactosidase est mesurée par hydrolyse de l'ortho-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG), dans du tampon Z + β -mercapto-éthanol (2,7 ml/l), à température ambiante, en suivant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm. L'activité β -glucuronidase est mesurée dans du milieu 63 + β -mercapto-éthanol (2,7 ml/l), à température ambiante, par

hydrolyse du 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (PNPU). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (1 unité = $1000 * \Delta DO_{410nm} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} / 3,5 / \text{quantité de protéines en mg/ml}$).

b) Dosage sur des cellules perméabilisées

L'activité des fusions *pelC::lacZ*, *pelE::lacZ*, *outC::lacZ* et *epsG::lacZ* a été mesurée sur des cellules perméabilisées au toluène. L'activité spécifique est exprimée en nanomoles de produit libéré par minute et par milligramme de poids sec bactérien à 37°C.

6. DOSAGE DE L'ACTIVITE PECTATE-LYASE

L'activité pectate-lyase est mesurée, sur des cellules en phase stationnaire perméabilisées au toluène, à 37°C dans du tampon PL (Tris-HCl 50mM pH 8,5, CaCl₂ 0,1 mM, PGA 0,05%), par dégradation du PGA (Sigma) en oligogalacturonides insaturés absorbant à 235 nm (Moran et coll., 1968). L'activité spécifique est exprimée en micromoles de produit insaturé libéré par minute et par milligramme de poids sec bactérien.

7. DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin (Lowry et coll., 1951) ; une solution de serum-albumine bovine est utilisée pour la gamme étalon.

E. TESTS DE VIRULENCE

Les bactéries sont cultivées une nuit en milieu LB, centrifugées puis resuspendues dans de l'eau physiologique. Les tubercules de pomme de terre sont lavés, stérilisés en surface par du NaOCl 0,5%, rincés à l'eau stérile puis séchés. L'inoculation est réalisée avec 10^7 bactéries dans un volume de 5 μ l dans un trou creusé à l'aide d'un cône de micropipette. Les tubercules sont incubés à 30°C pendant 48 à 72 h. Les feuilles d'endive sont lavées à l'eau stérile puis scarifiées au scalpel. L'inoculation est réalisée au niveau de l'incision avec 10^6 bactéries dans un volume de 5 μ l, les feuilles sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

III. RESULTATS

A. CLONAGE MOLECULAIRE DES GENES DE BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ *Erwinia chrysanthemi*

1. COMPLEMENTATION DE LA MUTATION *mdoH200::Tn10* A L'AIDE D'UN PLASMIDE CONJUGATIF

La très forte similitude de structure du squelette glucosidique des OPG synthétisés par *E. chrysanthemi* et *E. coli* présageait une forte conservation des gènes de biosynthèse entre ces deux espèces, hypothèse validée par l'homologie fonctionnelle et la similitude de séquence des locus *hrpM* de *P. syringae* et *mdoGH* d'*E. coli*.

Cependant, l'absence de phénotype distinguable des souches Mdo⁺ et Mdo⁻ (Bohin et Kennedy, 1984a) rend extrêmement difficile un clonage par complémentation, le seul crible possible étant le dosage systématique des OPG après un marquage radioactif spécifique.

Or, chez *E. coli*, le locus *mdoGH* est situé à environ 13 kb du locus *pyrC* (Bohin et Kennedy, 1984a ; Blattner et coll., 1997). La stratégie utilisée a donc été de cloner de grands fragments de chromosome susceptibles de porter à la fois le locus homologue à *pyrC* et le locus homologue à *mdoGH*. Pour cela, nous avons utilisé un plasmide conjugatif à large spectre d'hôte, pULB110, dérivé du RP4, capable de mobiliser à haute fréquence de l'ADN chromosomique grâce à la présence d'un phage Mu défectif (Van Gijsegem et Toussaint, 1983 ; Van Gijsegem et coll., 1985).

Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat, de l'UMR 5577 CNRS/INSA de Lyon, a obtenu 4 transconjugants prototrophes issus d'une conjugaison intergénérique entre une souche d'*E. chrysanthemi* sauvage possédant pULB110 et NFB216 (*mdoH200::Tn10, pyrC*).

Un seul des 4 R-prime obtenus, P24, permet de compléter la mutation *mdoH200::Tn10*, ceci avec une amplification de la synthèse d'un facteur environ 1,5 (Figure 10 page 71). La taille de ce plasmide, déterminée par restriction, est d'environ 100 kb, ce qui correspond à un insert d'environ 32 kb.

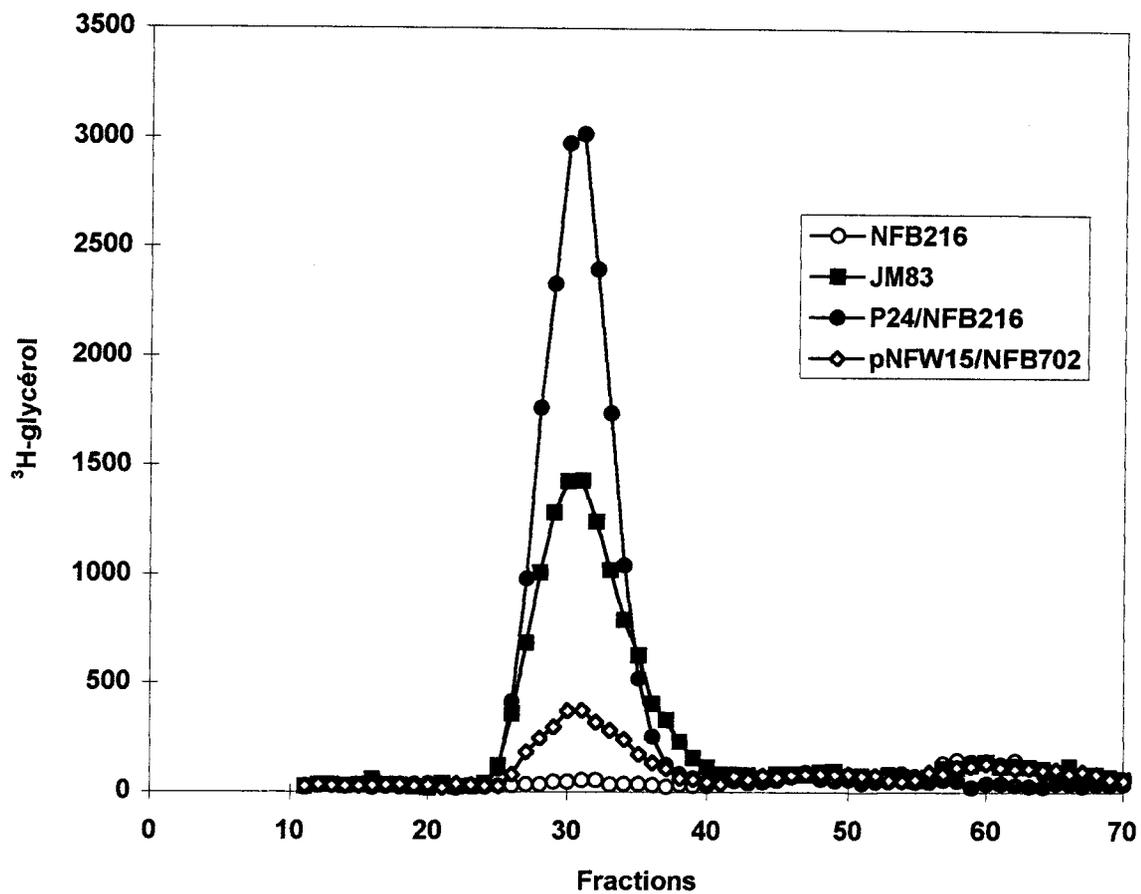


Figure 10 : Profil chromatographique sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 de 1,5 ml d'extrait pyridine des souches JM83 (Opg^+), NFB216 (*mdoH200::Tn10*), P24/NFB216, et pNFW15/NFB702 (*mdoG202::neo*), cultivées en milieu LOS [$2\text{-}^3\text{H}$]glycérol. Les fractions ont un volume de 1,5 ml. Les résultats sont exprimés en cpm pour 0,4 ml de chaque fraction.

2. CLONAGE DANS UN PLASMIDE A COPIES MULTIPLES

a) Sous-clonage à partir du R-prime

L'ADN du plasmide P24 a été digéré séparément par *EcoRI* et *BamHI*. Les fragments obtenus ont été clonés dans le vecteur pYZ4, puis 48 clones de chaque clonage ont été testés pour leur capacité à compléter la mutation *mdoH200::Tn10*.

Seuls 4 transformants issus du clonage par *EcoRI* se sont révélés positifs (Tableau 4 page 75). Dans les 4 cas, l'insert est constitué d'un fragment de 9,5 kb dont l'orientation dans les plasmides pNFW1, pNFW2 et pNFW4 est inverse à celle obtenue dans pNFW3 (Figure 11 page 76). Contrairement à ce qui est obtenu avec le plasmide P24, aucune amplification de la synthèse n'est observée, et la quantité d'OPG produite est fonction de l'orientation de l'insert.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène est que le promoteur est absent mais que l'homologue de *mdoH* s'exprime suffisamment pour compléter la mutation *mdoH200::Tn10* soit partiellement lorsque placé contre *plac* de pYZ4 (pNFW1), soit à un niveau identique à celui d'une souche sauvage lorsque placé sous le contrôle de *plac* (pNFW3). En effet, une complémentation sans amplification de la synthèse d'OPG de la mutation *mdoH200::Tn10* par un plasmide portant l'opéron *mdoGH* délété de son promoteur a été observé par Lacroix et coll. (1989) lors du clonage de *mdoGH*.

Pour confirmer cette hypothèse, l'insert du plasmide pNFW3 a été cloné dans les 2 orientations dans le vecteur pUC18, puis introduit dans NFB702 (*mdoG202::neo*). Une complémentation partielle n'est observée que lorsque l'insert est placé dans la même orientation, par rapport à *plac*, que dans pNFW3 (pNFW15, Figure 10 page 71).

D'autre part, le séquençage des extrémités de l'insert a montré que l'extrémité immédiatement adjacente à *plac* dans les plasmides pNFW3 et pNFW15 est semblable au début de la phase codante de *mdoG*. De plus, dans le plasmide pNFW15, *lac* et l'homologue de *mdoG* sont en phase, permettant ainsi l'expression d'une protéine de fusion au niveau de l'acide aminé homologue à l'acide aminé N° 72 de MdoG.

Le fait que cette protéine de fusion puisse compléter la mutation *mdoG202::neo* est très déconcertant puisque la protéine ainsi obtenue est non seulement délétée des 50 premiers acides aminés de sa forme mature (ce qui a été confirmé par le séquençage complet du gène, voir paragraphe B page 74) mais surtout ne possède pas de peptide signal.

Afin de déterminer si ce phénomène est également observé avec MdoG, une fusion LacZ''MdoG a été construite par clonage du fragment *XhoI-SalI* de pNF252 (coordonnées 0,7

et 2 kb Figure 37 page 119) au site *SaI*I de pUC8, ce qui permet l'obtention d'une protéine de fusion au niveau de l'acide aminé N° 80 de MdoG. Cette construction ne permet aucune complémentation de la mutation *mdoG202::neo*.

Trois hypothèses sont envisageables pour expliquer la complémentation partielle de la mutation *mdoG202::neo* par le plasmide pNFW15, la première étant que le pic observé n'est pas constitué d'OPG. Cette hypothèse est toutefois improbable puisque les caractéristiques biochimiques du produit (profil chromatographique mais surtout marquage au [2-³H]glycérol) correspondent à celle des OPG d'*E. coli* et que l'existence de ce pic est fonction de l'orientation de l'insert du plasmide pNFW15, et donc de l'existence de la protéine de fusion. Néanmoins, si on considère cette hypothèse comme fautive, il faut imaginer que soit la protéine homologue de MdoG a une fonction dans le cytoplasme (et ce malgré sa localisation périplasmique, confirmée dans la suite de cette étude), soit qu'une fraction des protéines de fusion est localisée dans le périplasma et permette de compléter la mutation *mdoG202::neo* (et ce malgré la délétion des 50 premiers acides aminés de la forme mature de l'homologue de MdoG).

Une étude structurale approfondie du produit obtenu sera donc nécessaire afin de déterminer si la protéine de fusion permet ou non de compléter la mutation *mdoG202::neo* et, si tel est le cas, si la protéine de fusion est localisée ou non dans le périplasma.

b) Clonage de l'extrémité 5'

Des essais de clonage de l'extrémité 5' manquante par *Bam*HI et par *Eco*RV s'étant révélés infructueux, un fragment chevauchant le fragment *Eco*RI-*Eco*RI de 9,5 kb a été recherché par hybridation moléculaire. Le fragment *Eco*RI-*Bam*HI de 1,1 kb de pNFW3 (coordonnées 0,3 et 1,5 kb Figure 11 page 76) a été utilisé comme sonde, l'ADN du plasmide P24 a été digéré par *Bam*HI, *Eco*RV, *Nco*I, *Sa*I, *Xho*I, et ces mêmes enzymes plus *Eco*RI. Le fragment *Sa*I-*Sa*I de 3,3 kb ainsi détecté a été purifié puis cloné dans le vecteur pUC18, de manière à ce que l'homologue de *mdoG* soit orienté contre *plac*. Le plasmide obtenu, pNFW27, permet la complémentation de la mutation *mdoG202::neo* ainsi qu'une synthèse d'OPG osmorégulée (Tableau 4 page 75), il contient donc l'homologue de *mdoG*, le promoteur et les séquences régulatrices.

c) Reconstitution de l'opéron en entier

En se basant sur la taille de *mdoGH* (4,4 kb, Loubens et coll., 1993) et sur le séquençage de l'extrémité 5' du fragment *EcoRI-EcoRI* de 9,5 kb, l'homologue de *mdoGH* se termine probablement entre les 2 sites *NcoI* du fragment *EcoRI-EcoRI* (Coordonnées 3,8 et 4,6 kb, Figure 11 page 76). Le fragment *BamHI-EcoRV* de pNFW3 a donc été cloné aux sites *BamHI* et *SmaI* de pNFW27. Le plasmide résultant, pNFW32, a été introduit dans différents contextes génétiques, et le contenu en OPG a été analysé après culture à haute et à basse osmolarité (Tableau 4 page 75).

Le plasmide pNFW32 porte, en entier, l'homologue de *mdoGH*: il permet non seulement de compléter les mutations de chacun des deux gènes chez *E. coli*, d'amplifier la synthèse par rapport à une souche sauvage, mais aussi d'obtenir une synthèse d'OPG osmorégulée. Compte tenu de cette homologie fonctionnelle, l'homologue de *mdoGH* chez *E. chrysanthemi* a été nommé *opgGH*.

B. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE ET CARACTERISATION DES PRODUITS DE *opgGH*

1. SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE

Avec l'aide de Silvia Altabe, chercheur post-doctorant au laboratoire, la séquence complète de *opgGH* a été déterminée. Le séquençage a été réalisé sur les deux brins, depuis le site *EcoRV* (coordonnées 0 kb, Figure 11 page 76) jusqu'au site *AgeI* (coordonnée 4,4 kb) soit 4422 pb. La stratégie de séquençage utilisée est représentée Figure 12 page 77. La séquence nucléotidique ainsi que la séquence déduite en acides aminés sont représentées Figure 13 page 78.

2. OpgG : UNE PROTEINE PERIPLASMIQUE HOMOLOGUE A MdoG

a) Détermination du codon d'initiation

Des études statistiques ont montré que, chez *E. coli*, ATG est utilisé dans 90% des cas comme codon d'initiation, les codons d'initiation alternatifs étant GTG (dans 8% des cas) et TTG (dans 1% des cas), ATT n'étant utilisé que dans le cas du gène *infC* (Gualerzi et Pon, 1990). Cet usage semble généralisable à *E. chrysanthemi*, puisque en considérant les 79 protéines présentes dans la banque SWISS-PROT, les codons d'initiation, démontrés ou potentiels, sont ATG dans 85% des cas, GTG dans 12,5% des cas et TTG dans 2,5% des cas.

Souches	Conditions de culture	
	LOS	LOS + 0,3M NaCl
NFB702	1000	ND
NFB216	840	ND
JM83	6160	1130
P24/NFB216	9040	ND
pNFW1/NFB216	3470	ND
pNFW2/NFB216	3390	ND
pNFW3/NFB216	6160	ND
pNFW4/NFB216	3280	ND
pNFW15/NFB702	2380	ND
pNFW27/NFB702	6800	2750
pNFW32/NFB702	12990	3590
pNFW32/NFB216	12780	4250
pNFW32/JM83	10030	2600

Tableau 4 : Radioactivité des extraits pyridine après marquage en milieu LOS [2-³H]glycérol. Les résultats sont exprimés en cpm pour 0,2 ml d'extrait. ND signifie non déterminé.

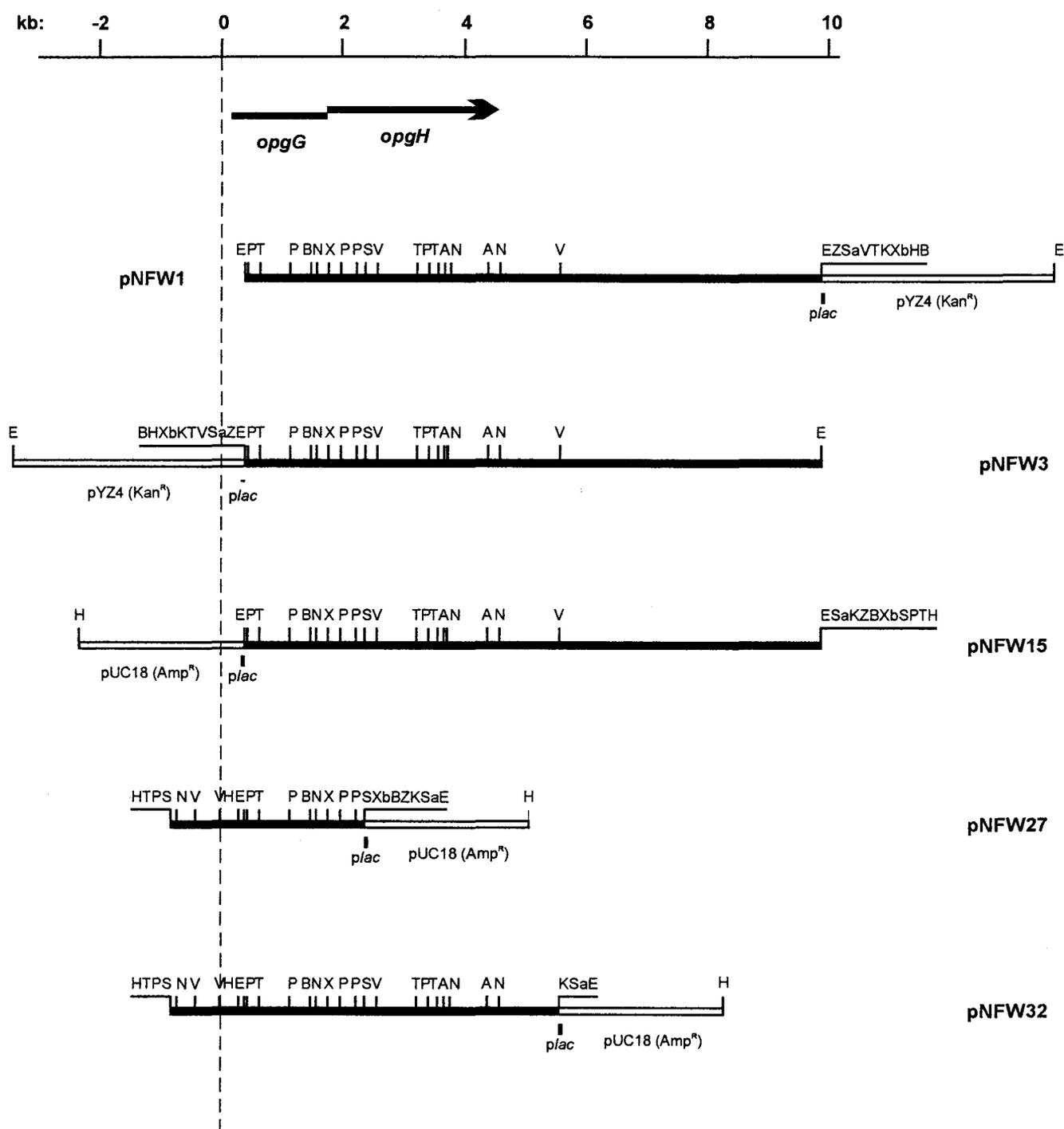


Figure 11 : Carte de restriction des principaux plasmides utilisés lors du clonage moléculaire de l'opéron *opgGH*. A, *AgeI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *HindIII* ; K, *KpnI* ; N, *NcoI* ; P, *PstI* ; S, *SaII* ; Sa, *SacI* ; T, *SphI* ; V, *EcoRV* ; X, *XhoI* ; Xb, *XbaI* ; Z, *SmaI*.

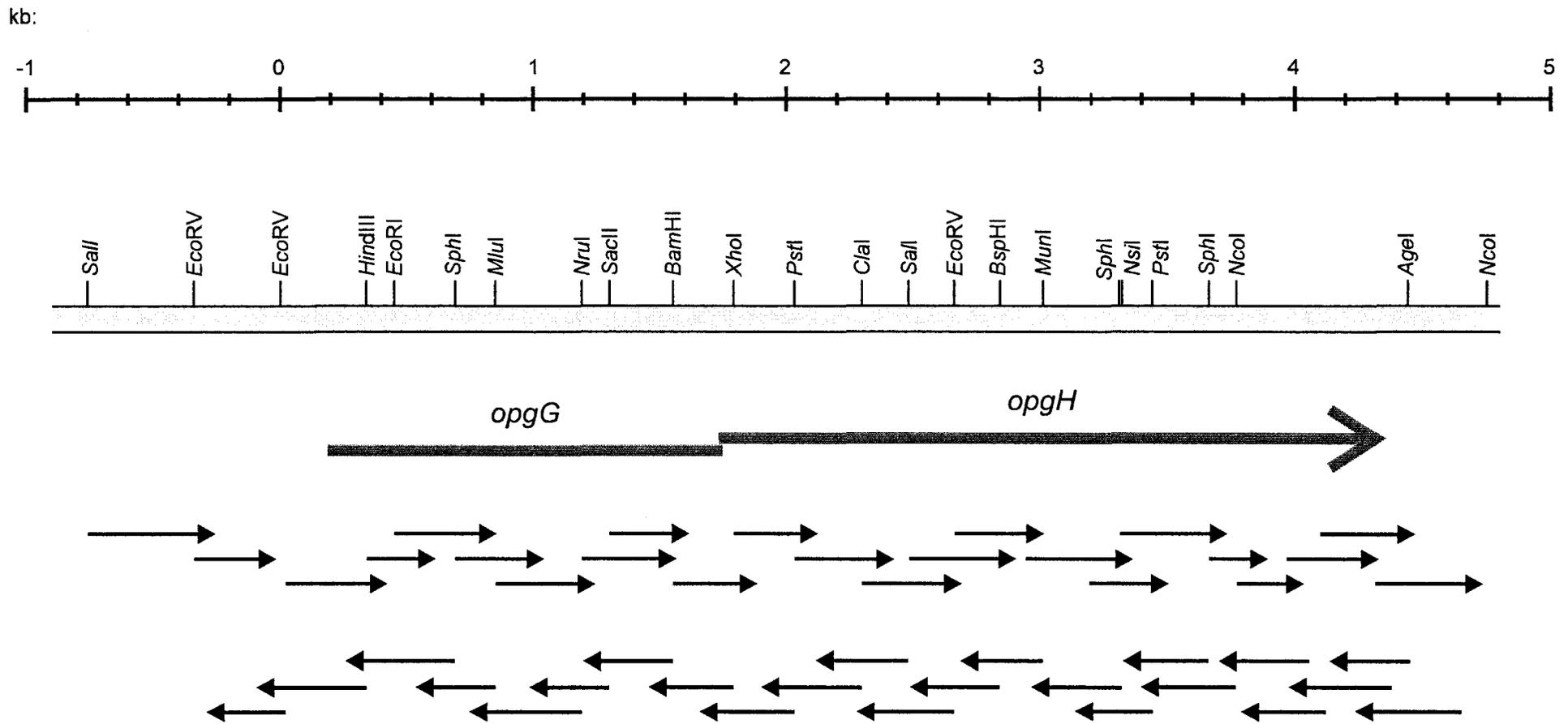


Figure 12 : Stratégie de séquençage du locus *opgGH*. La direction des flèches indique le sens de lecture des plasmides séquencés.

Figure 5 : Séquence nucléotidique de l'opéron *opgGH*. La séquence nucléotidique du brin non codant est notée de 5' en 3'. La séquence peptidique déduite est également indiquée. Les séquences promotrices -10 et -35, ainsi que la séquence de Shine-Dalgarno (SD) sont soulignées. Les étoiles indiquent les sites potentiels d'initiation de la transcription. Le peptide signal de OpgG est souligné ; le double soulignement indique la séquence répétée directe, ainsi que les séquences répétées inversées du terminateur de transcription. Une partie de la séquence du brin codant de *msyB* orf2 est également représentée.

GATATCCGTTATGGTTTTTCATCCTGAAAAGGCGGTTTGT	<u>TTAAGCGCGTCAATTAAGCGCGTCAA</u>	TGTTGTTTAAACGGTGACCTATTATGATGAAC	100
<i>EcoRV</i>			
	-35	-10	**
CATTCTTTTCTCAAG	<u>TTGTCG</u>	GAAAGCTAACTTATCCAT	<u>TAATAT</u>
		GGGTTTT	<u>AG</u>
		TGATTTAGGCACACATAC	<u>AGGG</u>
		GGAGAT	GTG CTG GTT AAT
			<u>M L V N</u>
AAA TTT AGG GTT AAG CAG CGG GTT GCT AAT CTT CGC TGG GTT TCA GCT GCG GTT ATG TTG TCT CTG ACA TCA TTG	271		
<u>K F R V K Q R V A N L R W V S A A V M L S L T S L</u>			
	<i>HindIII</i>		
CAC GCT TGG GCT TTT TCC ATT GAC GAT GTT GCG CAA AAG GCG GAA	<u>AAG CTT</u>	GCT GAA AAG GGG TAT GAA GCG CCA	346
<u>H A W A</u>	F S I D D V A Q K A E	K L A E K G Y E A P	
AAG AGT AAT CTT CCG GCC CAA TTT CGC GAC ATG AAA TTC GCC GAT TAT CAG CAG ATT CGC TTC AAC CAG GAC AAA	421		
K S N L P A Q F R D M K F A D Y Q Q I R F N Q D K			
	<i>EcoRI</i>		
TCC TAC TGG <u>AAT</u> TCG GAC CAG ACG CCT TTC AAA CTG CAG TTC TAC CAT CAG GGT ATG TAT TTT GAC ATT CCG GTC	496		
S Y W <u>N</u> S D Q T P F K L Q F Y H Q G M Y F D I P V			
AAA ATC AAT GAA GTG ACT GCC ACT GAA GTC AAC GAA ATC AAA TAT TCT ACC GAC TAT TTT AAT TTT GGC TCC GTT	571		
K I N E V T A T E V N E I K Y S T D Y F N F G S V			
AAC CAT GAT CCG GCA ACG GTG AAA GAT CTG GGC TTC GCG GGC TTC AAG GTG CTT TAC CCG ATC AAC AAA GCG GAT	646		
N H D P A T V K D L G F A G F K V L Y P I N K A D			
	<i>SphI</i>		
AAG CAC GAC GAA ATT CTC <u>AGC ATG</u> CTG GGC GCG AGT TAT TTC CGC GTG GTA GGT AAA GGA CAA GTT TAT GGT CTG	721		
K H D E I L <u>S M</u> L G A S Y F R V V G K G Q V Y G L			
TCG GCC CGC GGT CTG GCT ATC GAC ACG GCG TTG CCG TCT GGC GAA GAG TTC CCG CGT TTC CGC GAG TTC TGG ATA	796		
S A R G L A I D T A L P S G E E F P R F R E F W I			

GAG	CAT	CCG	AAG	CCG	GAA	GAC	AAG	CAT	CTG	GTC	ATT	TAC	GCG	TTG	CTG	GAT	TCT	CCA	CGC	TCC	GTC	GGT	GCC	TAC	871
E	H	P	K	P	E	D	K	H	L	V	I	Y	A	L	L	D	S	P	R	S	V	G	A	Y	
CGC	TTT	GTG	CTC	TAT	CCG	GGC	AGC	GAC	AGC	ATG	ATG	GAT	GTG	GAA	GCT	AAG	GTT	TAT	CTG	CGC	GAC	AAA	GTG	GGC	946
R	F	V	L	Y	P	G	S	D	S	M	M	D	V	E	A	K	V	Y	L	R	D	K	V	G	
AAA	CTG	GGC	GTG	GCG	CCG	CTG	ACC	AGC	ATG	TTC	CTG	TTT	GGG	CCG	AAC	CAG	CCG	TCT	CCG	ACG	TTG	AAC	TAT	CGT	1021
K	L	G	V	A	P	L	T	S	M	F	L	F	G	P	N	Q	P	S	P	T	L	N	Y	R	
CCG	GCG	CTG	CAT	GAT	TCC	AAC	GGC	TTG	TCC	ATC	CAT	GCC	GGC	AAC	GGC	GAG	TGG	ATC	TGG	CGT	CCG	CTG	AAT	AAT	1096
P	A	L	H	D	S	N	G	L	S	I	H	A	G	N	G	E	W	I	W	R	P	L	N	N	
CCG	AAG	CAC	CTG	GCG	GTG	AGT	ACC	TAT	ACG	ATT	GAG	AAT	CCG	AAA	GGC	TTC	GGG	CTG	CTG	CAG	CGT	GGT	CGC	GAT	1171
P	K	H	L	A	V	S	T	Y	T	I	E	N	P	K	G	F	G	L	L	Q	R	G	R	D	
TTC	TCC	GGT	TAT	GAA	GAT	TTG	GAT	GAT	CGT	TAC	GAT	CTG	CGT	CCC	AGC	GGC	TGG	ATT	GAA	ACC	AAG	GGC	GAC	TGG	1246
F	S	G	Y	E	D	L	D	D	R	Y	D	L	R	P	S	G	W	I	E	T	K	G	D	W	
GGT	AAA	GGC	AAG	GTG	GAA	CTG	GTA	GAA	ATT	CCG	ACC	GCG	GAT	GAA	ACC	AAC	GAT	AAC	ATT	GTG	GCT	TTC	TGG	ACG	1321
G	K	G	K	V	E	L	V	E	I	P	T	A	D	E	T	N	D	N	I	V	A	F	W	T	
CCG	GAA	AAC	CTG	CCT	GAG	AAA	GGC	AAG	CCG	CTG	GAA	GTT	AAG	TAC	CGC	TTG	CAT	TTC	ACC	AAG	GAC	GAA	GAA	GCG	1396
P	E	N	L	P	E	K	G	K	P	L	E	V	K	Y	R	L	H	F	T	K	D	E	E	A	
CTG	CAT	TCG	CCG	GAA	CAG	GCT	TAT	GTG	ATG	CAG	ACC	ATG	CGT	TCA	ACC	GGC	GAT	GTG	AAA	CAG	TCA	AAT	CTG	ATT	1471
L	H	S	P	E	Q	A	Y	V	M	Q	T	M	R	S	T	G	D	V	K	Q	S	N	L	I	
CGC	CAG	CCG	GAC	GGC	ACT	ACT	GCA	TTC	CTG	GTC	GAT	TTC	GTC	GGC	GGC	AAA	TTG	AAG	GAT	TTG	GAT	CCG	AAT	ACG	1546
R	Q	P	D	G	T	T	A	F	L	V	D	F	V	G	G	K	L	K	D	L	D	P	N	T	
CCG	ATC	GCG	TCA	CAA	GCC	AGT	ATC	GGT	GAC	AAC	GGC	GAA	ATT	GTG	GAA	AAC	AGT	GTT	CGC	TAT	AAT	CCG	GTA	ACC	1621
P	I	A	S	Q	A	S	I	G	D	N	G	E	I	V	E	N	S	V	R	Y	N	P	V	T	
CAT	GGC	TGG	CGC	CTG	ACA	CTG	CGT	ATG	AAA	GTG	AAG	GAC	AAC	AAG	CAG	CCG	ACG	GAA	ATG	CGA	GCG	GCA	TTG	GTC	1696
H	G	W	R	L	T	L	R	M	K	V	K	D	N	K	Q	P	T	E	M	R	A	A	L	V	

																M	N	K	S	T	S	T	L		
AAT	GGC	GAA	ACC	ACA	TTG	ACT	GAA	ACC	TGG	AGC	TAT	CAG	CTG	CCT	GCT	<u>AAT</u>	GAAT	AAA	TCA	ACT	TCT	ACT	CTC		1769
N	G	E	T	T	L	T	E	T	W	S	Y	Q	L	P	A	N	E								
E	Y	I	E	K	L	P	L	P	A	E	Q	A	E	A	L	R	E	K	F	S	A	S	Q	D	
GAG	TAT	ATC	GAG	AAA	TTG	CCT	CTG	CCT	GCC	GAG	CAG	GCA	GAG	GCC	CTG	CGT	GAG	AAA	TTT	TCC	GCG	TCT	CAG	GAT	1844
L	S	S	L	H	Q	A	L	S	D	G	S	V	V	T	M	Q	S	P	D	D	I	P	L	V	
CTG	TCT	TCC	TTG	CAT	CAG	GCT	TTG	TCT	GAT	GGT	TCT	GTC	GTC	ACC	ATG	CAA	TCG	CCG	GAT	GAT	ATT	CCG	CTG	GTT	1919
S	V	P	R	R	L	E	L	A	W	E	D	G	L	N	G	G	K	Q	L	G	K	D	R	E	
TCC	GTA	CCG	CGT	CGT	CTG	GAG	CTG	GCA	TGG	GAA	GAC	GGG	CTA	AAC	GGC	GGC	AAG	CAA	CTG	GGT	AAA	GAC	CGT	GAA	1994
G	R	T	A	L	Q	A	M	P	R	I	T	R	A	S	M	F	P	D	A	W	Q	T	N	P	
GGG	CGA	ACT	GCG	CTG	CAG	GCG	ATG	CCG	CGT	ATC	ACC	CGT	GCC	TCC	ATG	TTC	CCC	GAT	GCC	TGG	CAG	ACG	AAC	CCG	2069
M	V	R	W	W	D	M	I	N	G	R	S	K	P	L	R	H	H	D	K	T	A	E	E	N	
ATG	GTG	CGC	TGG	TGG	GAT	ATG	ATC	AAC	GGG	CGC	TCC	AAG	CCA	CTC	CGC	CAT	CAT	GAT	AAG	ACG	GCG	GAA	GAG	AAC	2144
E	A	E	N	R	W	R	R	V	G	T	L	R	R	Y	V	L	L	L	L	T	L	F	Q	T	
GAA	GCG	GAG	AAT	CGC	TGG	CGC	AGA	GTA	GGG	ACG	TTG	CGT	CGC	TAT	GTT	CTT	CTG	CTG	CTG	ACG	CTG	TTT	CAG	ACC	2219
A	I	A	T	W	Y	M	K	T	I	L	P	Y	Q	G	W	A	L	I	D	P	F	A	M	V	
GCC	ATC	GCC	ACC	TGG	TAT	ATG	AAG	ACC	ATT	CTT	CCT	TAT	CAG	GGA	TGG	GCG	CTG	ATC	GAT	CCT	TTT	GCG	ATG	GTG	2294
H	Q	D	V	W	R	T	I	M	Q	L	L	P	Y	V	L	Q	S	G	I	L	I	L	F	A	
CAT	CAG	GAC	GTA	TGG	CGT	ACG	ATC	ATG	CAA	CTA	CTG	CCT	TAT	GTG	CTG	CAG	AGT	GGG	ATT	TTG	ATT	CTG	TTC	GCT	2369
I	L	F	C	W	V	S	A	G	F	W	T	A	L	M	G	F	L	Q	L	L	I	G	K	D	
ATC	CTG	TTT	TGC	TGG	GTA	TCG	GCT	GGT	TTT	TGG	ACC	GCA	CTA	ATG	GGG	TTC	CTG	CAA	CTG	CTG	ATC	GGA	AAA	GAC	2444
K	Y	S	I	S	S	T	T	T	G	N	E	P	L	N	P	E	H	R	T	A	L	I	M	P	
AAA	TAC	AGT	ATT	TCG	TCG	ACA	ACG	ACC	GGC	AAT	GAA	CCG	CTG	AAT	CCG	GAA	CAC	CGC	ACG	GCG	TTG	ATC	ATG	CCG	2519
I	C	N	E	D	V	E	R	V	F	A	G	L	R	A	T	Y	E	S	V	E	A	T	G	E	
ATC	TGC	AAC	GAA	GAT	GTG	GAA	CGT	GTC	TTC	GCG	GGC	TTG	CGG	GCG	ACT	TAC	GAG	TCG	GTT	GAG	GCT	ACC	GGC	GAG	2594

L	D	H	F	D	I	Y	V	L	S	D	S	N	D	P	D	I	C	V	A	E	Q	K	A	W	
CTG	GAT	CAC	TTT	GAT	ATT	TAT	GTG	CTC	AGC	GAC	AGT	AAC	GAT	CCG	GAT	ATC	TGC	GTC	GCT	GAA	CAG	AAA	GCG	TGG	2669
M	D	L	C	R	E	V	G	G	A	G	R	I	F	Y	R	R	R	R	R	R	V	K	R	K	
ATG	GAT	TTG	TGT	CGT	GAA	GTC	GGC	GGT	GCG	GGG	CGT	ATC	TTC	TAT	CGC	CGC	CGT	CGC	CGC	CGC	GTG	AAG	CGC	AAG	2744
S	G	N	I	D	D	F	C	R	R	W	G	N	Q	Y	S	Y	M	V	V	L	D	A	D	S	
AGC	GGC	AAC	ATC	GAC	GAT	TTC	TGC	CGT	CGC	TGG	GGC	AAT	CAG	TAC	AGC	TAT	ATG	GTC	GTG	CTG	GAT	GCC	GAT	AGT	2819
V	M	S	G	E	C	L	T	S	L	V	R	L	M	D	A	N	P	R	A	G	I	I	Q	S	
GTC	ATG	AGC	GGC	GAG	TGC	CTG	ACG	TCA	CTG	GTG	CGG	CTG	ATG	GAC	GCC	AAT	CCG	AGA	GCC	GGG	ATT	ATC	CAG	TCT	2894
A	P	R	A	S	G	M	D	T	L	Y	A	R	C	Q	Q	F	A	T	R	V	Y	G	P	L	
GCG	CCG	CGT	GCA	TCG	GGT	ATG	GAT	ACG	CTG	TAC	GCC	CGC	TGC	CAG	CAG	TTT	GCT	ACC	CGT	GTT	TAT	GGC	CCG	CTG	2969
F	T	A	G	L	H	F	W	Q	L	G	E	S	H	Y	W	G	H	N	A	I	I	R	V	K	
TTC	ACC	GCC	GGT	TTG	CAC	TTC	TGG	CAA	TTG	GGT	GAA	TCC	CAT	TAC	TGG	GGT	CAT	AAC	GCC	ATC	ATC	CGT	GTT	AAG	3044
P	F	I	E	H	C	A	L	A	A	L	P	G	E	G	S	F	A	G	S	I	L	S	H	D	
CCG	TTC	ATT	GAG	CAT	TGT	GCG	CTG	GCC	GCG	TTG	CCG	GGT	GAA	GGG	TCT	TTT	GCC	GGC	TCC	ATC	CTG	TCG	CAT	GAC	3119
F	V	E	A	A	L	M	R	R	A	G	W	G	V	W	I	A	Y	D	L	P	G	S	Y	E	
TTC	GTT	GAA	GCC	GCG	CTG	ATG	CGT	CGC	GCC	GGG	TGG	GGG	GTG	TGG	ATT	GCC	TAC	GAT	CTA	CCG	GGC	AGC	TAT	GAA	3194
E	L	P	P	N	L	L	D	E	L	K	R	D	R	R	W	C	H	G	N	L	M	N	F	R	
GAA	TTG	CCG	CCT	AAC	CTG	CTG	GAT	GAA	TTG	AAA	CGC	GAC	CGC	CGC	TGG	TGT	CAC	GGT	AAC	CTG	ATG	AAC	TTC	AGA	3269
L	F	L	V	K	G	M	H	P	V	H	R	A	V	F	L	T	G	V	M	S	Y	L	S	A	
CTG	TTC	CTG	GTT	AAA	GGC	ATG	CAT	CCG	GTG	CAC	CGT	GCG	GTG	TTT	CTG	ACC	GGG	GTA	ATG	TCT	TAC	TTG	TCC	GCG	3344
P	L	W	F	M	F	L	A	L	S	T	A	L	Q	V	V	H	T	L	M	E	P	Q	Y	F	
CCG	CTG	TGG	TTC	ATG	TTC	CTG	GCG	CTT	TCT	ACG	GCA	TTG	CAG	GTG	GTG	CAC	ACG	TTG	ATG	GAG	CCG	CAG	TAC	TTC	3419
L	Q	P	R	Q	L	F	P	V	W	P	Q	W	R	P	E	L	A	I	A	L	F	S	T	T	
CTG	CAG	CCT	CGT	CAG	CTG	TTT	CCG	GTA	TGG	CCA	CAG	TGG	CGG	CCG	GAA	CTG	GCG	ATA	GCT	TTG	TTC	TCG	ACA	ACA	3494

L V L L F L P K L L S V I L V C A K G A K S Y G G
 TTG GTT CTG CTG TTC CTG CCG AAA TTG CTG AGC GTT ATT CTG GTG TGT GCT AAA GGC GCT AAA TCA TAC GGC GGA 3569

V A K L F I S L L V E M L F S V L L A P V R M L F
 GTG GCC AAG CTG TTT ATC TCT CTG TTG GTT GAA ATG CTG TTT TCC GTG CTG CTG GCA CCG GTA CGC ATG CTG TTC 3644
SphI

H T V F V V S A F L G W S V Q W K S P Q R D D A
 CAC ACC GTG TTT GTG GTC AGC GCG TTT CTG GGA TGG TCG GTG CAG TGG AAA TCG CCG CAG CGT GAT GAT GAT GCT 3719

T P W S E A F A R H G S Q L L L G L V W A G G M A
 ACT CCC TGG AGC GAA GCG TTT GCC CGC CAT GGT TCT CAG CTG CTG TTG GGG CTG GTT TGG GCC GGC GGC ATG GCA 3794

W L D L R F L W W L A P I V F S L I L S P L V S V
 TGG CTG GAT TTA CGC TTC CTG TGG TGG CTG GCG CCT ATC GTC TTC TCG TTG ATC CTG TCG CCG TTG GTA TCA GTG 3869

L S S R A G L G L A C K R A K L L L I P E E S D P
 CTG TCC AGC CGT GCG GGT TTG GGG CTG GCC TGT AAA CGC GCC AAG CTG CTG TTG ATC CCG GAA GAG TCC GAT CCG 3944

P R E L V A T D E Y F R R N R E R K L D H G F M H
 CCG CGT GAG CTG GTT GCG ACC GAT GAG TAT TTC CGG CGC AAT CGT GAG CGC AAG CTG GAT CAT GGC TTC ATG CAC 4019

A I F D P S I N A L T S A M A T A R H R F S R P I
 GCG ATC TTT GAT CCG TCA ATC AAT GCG CTG ACC AGC GCA ATG GCA ACG GCG CGT CAC CGT TTC AGC AGG CCG ATT 4094

E D M R E Q R V N D A L S R K P Q D V D C N L R L
 GAG GAT ATG CGT GAA CAA CGT GTC AAT GAT GCG CTG AGT CGC AAA CCT CAG GAT GTT GAT TGC AAC CTG CGT CTG 4169

A L M S D P V T L A R L H H R V W S Q P D T H S D
 GCG TTG ATG AGC GAC CCG GTA ACC TTG GCT CGC CTG CAC CAT CGG GTG TGG AGC CAG CCG GAT ACT CAT AGC GAC 4244

W R S H Y Q T L A A P V I K S A Q
 TGG CGA AGC CAT TAC CAG ACC CTT GCC GCT CCG GTG ATT AAA AGC GCT CAG TGA GTCAGGGTGAACGACGAAAAAGCAAC 4324

GGCCAGTCCGTTGCTTTTTTTATGGGCTGAATACGGCATTGCCAGGATTATTTTTATCCTGCACCGGGGACGCGCT TTA TTC TGG TTC AGA 4415

CAC CGG TAT GCG ATT GGG TTT ACG GCG CAG AGA GAA CCA TGA GTA GAA CAC GTT GAT CAT CAC GAC GGC...

AgeI

Le premier cadre ouvert de lecture débute au nucléotide N°80 (par rapport au premier nucléotide du site *EcoRV*) et se termine par TAA en position 1751. Le premier ATG se trouve en position 251 mais n'a pas été retenu comme codon d'initiation potentiel car la similitude de séquences protéiques entre OpgG et MdoG débute avec l'acide aminé codé par le codon en position 227 (Figure 21 page 95). Les codons d'initiation potentiels sont donc 2 GTG, en position 83 et 185. Le GTG en position 83 étant situé en amont du promoteur putatif de *opgGH* (voir Initiation de la transcription, page 89), c'est le GTG en position 185 qui a été retenu comme codon d'initiation potentiel.

Chez *E. coli*, une région riche en purine d'une taille de 3 à 6 nucléotides, la séquence de Shine-Dalgarno, permet la fixation du ribosome par son appariement avec la région 3' de l'ARN16S de la sous-unité 30S du ribosome 3'-UUCCUCCAC-5'. La distance séparant la partie centrale de la séquence de Shine-Dalgarno (GGAGG) du codon d'initiation est généralement de 5 à 12 nucléotides, l'optimum étant de 7 à 9 nucléotides (Jacques et Dreyfus, 1990 ; Ringquist et coll., 1992 ; de Smit et Van Duin, 1994 ; Sprengart et Porter, 1997).

Nous proposons comme séquence de Shine-Dalgarno potentielle AGGG, 6 nucléotides en amont du codon d'initiation.

b) Localisation du produit de *opgG*

L'homologie fonctionnelle existant entre MdoG et OpgG ne permet pas de doute quant à la localisation périplasmique de OpgG. De plus, une méthode prédictive d'identification de peptide signal (Nielsen et coll., 1997) montre que les 33 premiers acides forment un peptide signal putatif (Figure 14 page 86). Le score de prédiction est de 0,809 pour un maximum possible de 1.

Cette séquence de 33 acides aminés possède toutes les caractéristiques d'un peptide-signal (Pugsley, 1993 ; Izard et Kendall, 1994) Elle présente une région amino-terminale polaire, chargée positivement de par la présence de résidus de lysine (en position 5 et 9) et arginine (en position 7 et 11). La région centrale est hydrophobe, constituée en particulier de leucine (15, 24 et 26), alanine (13, 20 et 21) et valine (en position 12, 18 et 22). La région carboxy-terminale du signal est moins hydrophobe et possède les 2 acides aminés primordiaux, en position -1 et -3 par rapport au site de clivage, qui constituent le site de reconnaissance de la signal-peptidase (alanine en position 31 et 33).

Le site de clivage le plus probable est situé entre les acides aminés N°33 et 34 (...HAWA - FSID...). Loubens et coll. (1993) ont montré que ce site de clivage est également

utilisé dans le cas de MdoG (...SSWA - FSID...) ce qui a été confirmé par le séquençage de l'extrémité aminée de la protéine mature (Link et coll., 1997).

Afin de vérifier le caractère périplasmique de OpgG, de valider le choix du peptide signal prédit, et de confirmer GTG en position 185 comme codon d'initiation, une analyse par fusions de gènes a été entreprise, en utilisant *blaM*, codant la β -lactamase, comme gène rapporteur.

La β -lactamase confère aux cellules qui l'expriment la résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, comme l'ampicilline. Sa localisation périplasmique est indispensable car ces antibiotiques ne traversent pas la membrane cytoplasmique. Ils ont pour cible des enzymes situées sur la face périplasmique de la membrane interne et impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (Spratt, 1983). L'utilisation de la β -lactamase permet de discriminer les fusions périplasmiques des fusions cytoplasmiques grâce à une différence phénotypique de résistance à l'ampicilline (Broome-Smith et Spratt, 1986). En effet, des fusions périplasmiques permettent aux cellules de résister individuellement à l'ampicilline, alors que les fusions cytoplasmiques ne le permettent pas. En revanche, lorsque l'on dépose sur une boîte de Petri contenant de l'ampicilline une grande quantité de cellules exprimant une fusion cytoplasmique, certaines vont résister et croître. Cette résistance collective est due à une diminution locale de la concentration en ampicilline, hydrolysée par les protéines fusions issues des cellules déjà lysées.

Une méthode d'analyse topographique de protéines membranaires, décrite par Broome-Smith et coll. (1990), consiste à effectuer des délétions ménagées du gène étudié, cloné dans le vecteur pYZ4, par l'exonucléase III. Une version tronquée (*'blaM*) du gène *blaM*, codant la partie mature de la β -lactamase, est alors adjointe. Loubens et coll. (1993) ont construit un plasmide dérivé de pYZ4 contenant déjà *'blaM*. Ce plasmide, pNF150, permet d'obtenir *'blaM* en aval du site multiple de clonage de pYZ4. Il se révèle être un outil efficace pour réaliser des fusions aléatoires, car on supprime l'étape d'adjonction de *'blaM*. De plus, il permet, grâce à la présence du site multiple de clonage, de réaliser des fusions dans les 3 cadres de lecture. Il faut noter que ce plasmide présente une fusion *lacZ''blaM* qui permet l'expression d'une protéine hybride ayant une activité β -lactamase cytoplasmique. D'après les auteurs, cette technique permet de remplacer avantageusement l'utilisation de la phosphatase alcaline car elle permet d'éliminer toutes les fusions qui ne sont pas en phase. D'autre part, elle base la discrimination de la localisation de l'enzyme à partir d'un phénotype qualitatif et non quantitatif.

Le clonage du fragment *EcoRV-BamHI* de *opgG* dans le plasmide pNF150, en phase avec *blaM* (Figure 15 page 87), permet l'expression d'une protéine de fusion à activité périplasmique, confirmant ainsi la localisation périplasmique de OpgG. La délétion par *HindIII* de ce fragment (Figure 15 page 87) conduit à l'obtention d'une fusion *opgG''blaM* 12 acides aminés en aval de la séquence signal putative de OpgG (Figure 16 page 88). L'activité de la protéine fusion obtenue est également périplasmique.

La validité du peptide signal putatif de OpgG a ensuite été testée en effectuant des délétions ménagées par l'Exonucléase III à partir du site *HindIII*, en utilisant le site *SphI* comme site protecteur vis-à-vis de l'enzyme. 4 fusions à activité cytoplasmique ont été obtenues, et le séquençage a montré que les 4 points de fusion sont situés en amont du site de clivage prédit, plus précisément au niveau des acides aminés N°17, 14, 9 et 5 de OpgG (Figure 16 page 88).

c) La protéine OpgG

D'après les observations précédentes, *opgG* code une protéine de 522 acides aminés, d'un poids moléculaire de 59126. Le peptide signal étant constitué des 33 premiers résidus, la forme mature de OpgG a une taille de 489 acides aminés, et un poids moléculaire de 55378. OpgG est, comme MdoG, une protéine globalement hydrophile. Les profils d'hydrophobie de ces 2 protéines; obtenus selon la méthode de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982), sont d'ailleurs pratiquement superposables (Figure 17 page 89).

d) Similitude de séquence avec MdoG et Orf1 de *hrpM*

L'alignement des séquences peptidiques de OpgG, MdoG, et Orf1 de *hrpM* est représenté Figure 18 page 91. L'identité des séquences peptidiques entre les 3 protéines est de 58,7 % (301/513), le pourcentage de similitude est de 74,3 % (381/513).

3. OpgH : UNE PROTEINE HOMOLOGUE A MdoH

a) La protéine OpgH

Le second cadre ouvert de lecture débute au nucléotide 1716 et se termine par TGA en position 4296. Le premier ATG se trouve en position 1746, soit 3 nucléotides en amont du codon stop de *opgG*, sans qu'une séquence de Shine-Dalgarno ne puisse être détectée en amont.

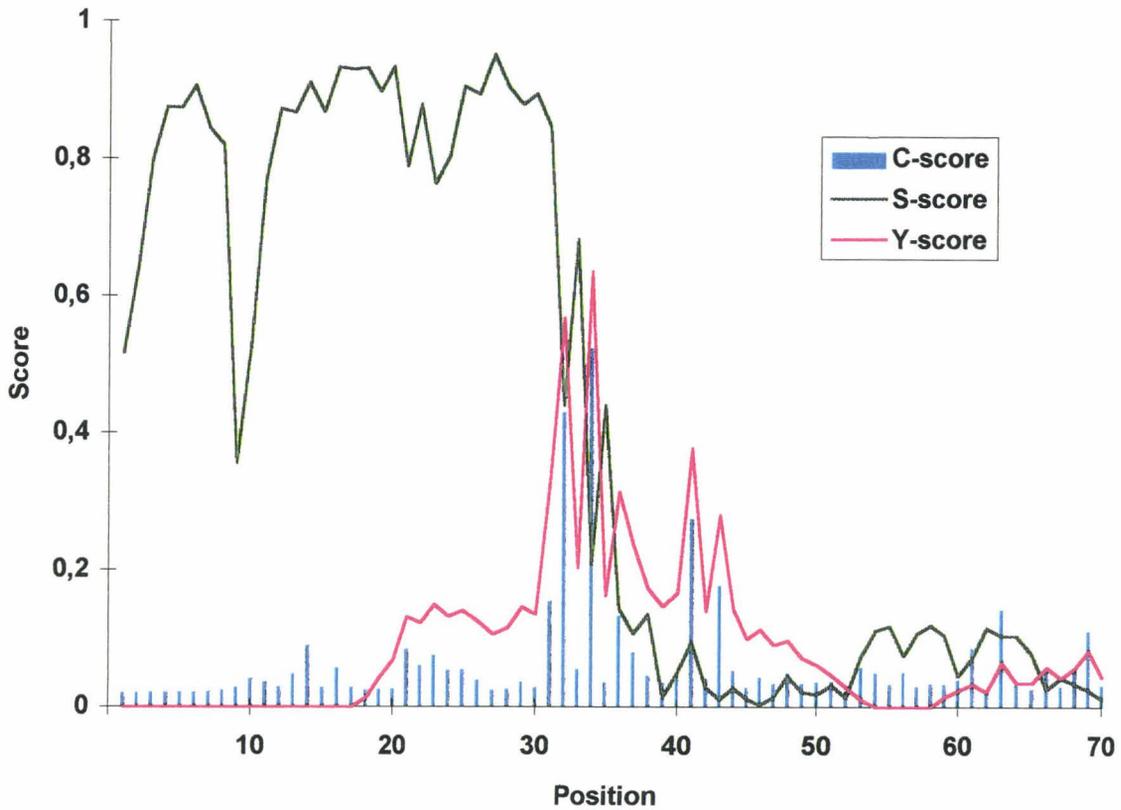


Figure 14 : Recherche de peptide signal selon la méthode de prédiction de Von Heijne. C-score représente la probabilité de clivage (doit être élevé en position +1, immédiatement après le site de clivage, et bas partout ailleurs). S-score représente la probabilité d'existence d'un peptide signal (doit être élevé à toutes les positions en amont du site de coupure, et bas jusqu'à 30 résidus en aval). Y-score représente la probabilité de clivage optimisée en combinant C-score et S-score.

pNFW78 (périplasmique)

M L V N K F R V K Q R V A N L R W V S A A V M L S
GTG CTG GTT AAT AAA TTT AGG GTT AAG CAG CGG GTT GCT AAT CTT CGC TGG GTT TCA GCT GCG GTT ATG TTG TCT
L T S L H A W A F S I D D V A Q K A E K* L L L E V
CTG ACA TCA TTG CAC GCT TGG GCT TTT TCC ATT GAC GAT GTT GCG CAA AAG GCG GAA AAG CTT CTT CTA GAG GTA
 P H A I S S S
 CCG CAT GCG ATA TCG GAG CTC ...
SphI

Δ81pb pNFW78 (cytoplasmique)

M L V N K F R V K Q R V A N L R W A* I S S S P L
GTG CTG GTT AAT AAA TTT AGG GTT AAG CAG CGG GTT GCT AAT CTT CGC TGG GCG ATA TCG AGC TCT CCC CTG ...

Δ90pb pNFW78 (cytoplasmique)

M L V N K F R V K Q R V A N P* I S S S P L R H P
GTG CTG GTT AAT AAA TTT AGG GTT AAG CAG CGG GTT GCT AAT CCG ATA TCG AGC TCT CCC CTG CGT CAC CCA ...

Δ105pb pNFW78 (cytoplasmique)

M L V N K F R V K P* I S S S P L R H P E T L V K
GTG CTG GTT AAT AAA TTT AGG GTT AAG CCG ATA TCG AGC TCT CCC CTG CGT CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA ...

Δ117pb pNFW78 (cytoplasmique)

M L V N K S* I S S S P L R H P E T L V K V K D A
GTG CTG GTT AAT AAA TCG ATA TCG AGC TCT CCC CTG CGT CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT ...

Figure 16 : Séquence des points de fusion des protéines hybrides OpgG''BlaM et localisation de l'activité β-lactamase des protéines de fusion obtenues. La séquence de *opgG'* est indiquée en gras, le peptide signal putatif est souligné, le début de la séquence de *'blaM* est également indiquée. Les acides aminés marqués * sont codés par des codons hybrides. ΔNpb indique le nombre de nucléotides délétés à partir du site *HindIII* de pNFW78.

Un chevauchement des cadres de lecture existe également dans le cas de *mdoGH* (Loubens et coll., 1993). Ce cas de figure est fréquent pour 2 phases ouvertes de lecture appartenant à la même unité de transcription (McCarthy et Gualerzi, 1990). La séquence chevauchante est dans les 2 cas ATGAATAA. L'utilisation de cet ATG comme codon d'initiation de la traduction ayant été démontrée pour MdoH (Debarbieux et coll., 1997), ce même codon a été retenu comme codon d'initiation de OpgH, qui est donc une protéine de 850 acides aminés, d'un poids moléculaire de 96786.

A priori, la topographie de OpgH au sein de la membrane interne est pratiquement identique à celle de MdoH. En effet, les profils d'hydrophobie de OpgH et MdoH sont pratiquement superposables (Figure 19 page 91), et la prédiction de structure secondaire à l'aide de logiciels tels que Tmpred (de l'Institut Suisse pour la Recherche Expérimentale sur le Cancer, Epalinges sur Lausanne, Suisse) ou TMAP (du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire, Heidelberg, Allemagne) est identique pour MdoH, OpgH et HrpM.

De plus, la séquence des segments transmembranaires décrits pour MdoH (Debarbieux et coll., 1997) est extrêmement conservée chez *E. chrysanthemi* (Figure 20 page 93).

b) Similitude de séquence avec MdoH et HrpM

L'alignement des séquences peptidiques de OpgH, MdoH, et HrpM est représenté Figure 20 page 93. L'identité des séquences peptidiques entre les 3 protéines est de 61,8 % (480/777), le pourcentage de similitude est de 76,1 % (591/777). On peut noter que les segments transmembranaires et le domaine cytoplasmique central sont très fortement conservés, à la différence des régions amino-terminale et carboxy-terminale.

4. L'OPÉRON *opgGH*

a) Initiation de la transcription

La comparaison de la région 5' de *opgGH* avec celle de *mdoGH* permet de définir comme séquence -10 potentielle TAATAT, 38 pb en amont du codon d'initiation de OpgG, et comme séquence -35 potentielle TTGTCG 18 pb en amont de la séquence -10. En effet, bien que ce promoteur soit relativement éloigné du consensus σ_{70} TTGACA N(17) TATAAT (Lisser et Margalit, 1993), les 31 pb incluant les séquences -10 et -35 montrent 81% d'identité avec le promoteur caractérisé de *mdoGH* (Figure 21 page 95).

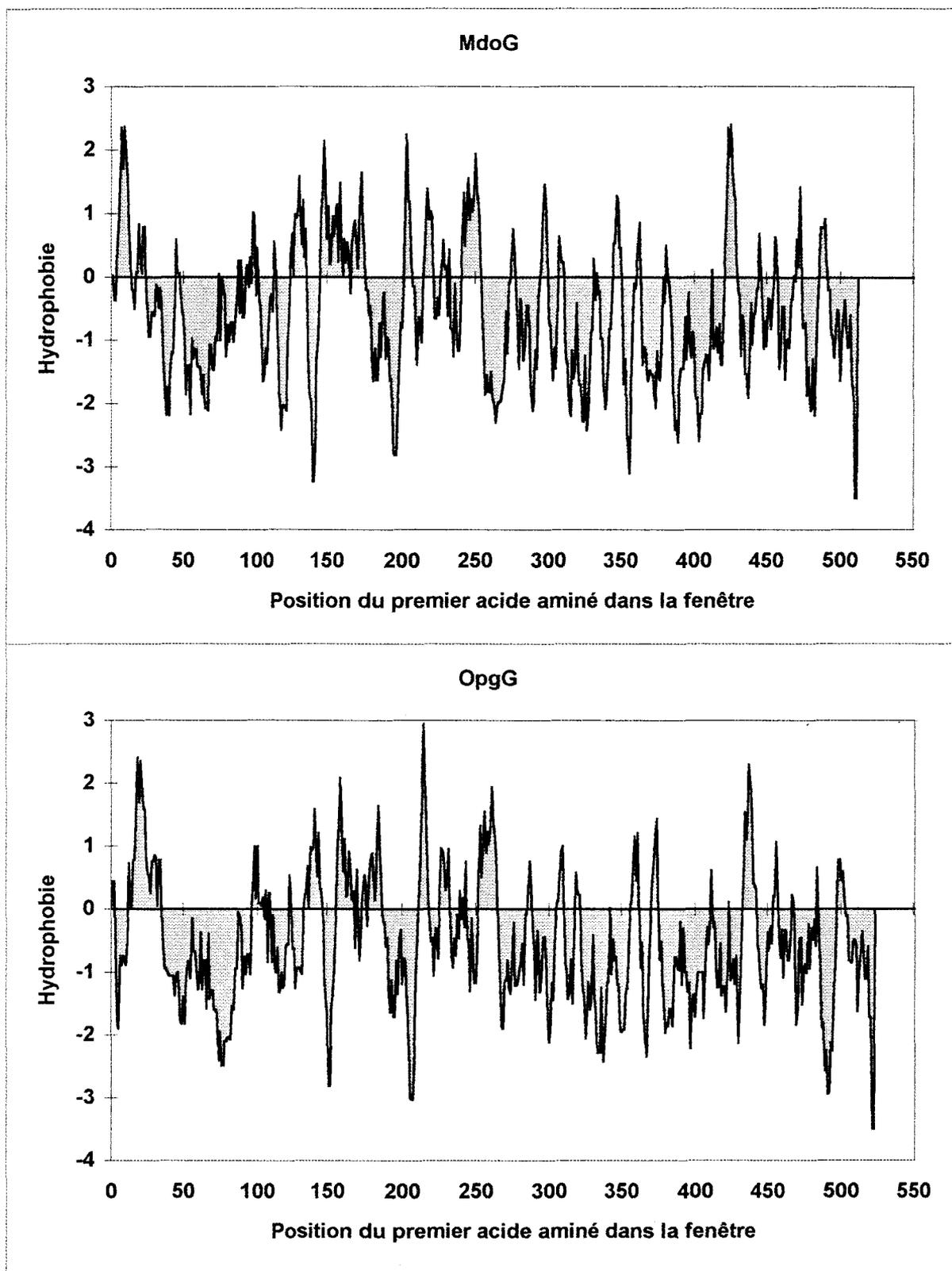


Figure 17 : Comparaison des profils d'hydrophobie des protéines MdoG et OpgG d'après la méthode de Kyte et Doolittle, avec une fenêtre de 7 acides aminés.

<i>E. coli</i>	1	MMKMRWLSAAVMLTLYTS--SSWAFSIDDVAKQAQSLAGKGYETPKSNLPSVFRDMKYADYQQIQFNHDKAYWNNLKTPF
<i>P. syringae</i>	1	MKRLRSALLASSALVCLFSAGQLWAFNLDVAAKAKEMAGQKFEAPRSNLPNELRDMKFFADYQKIRFRDDKAEWAGEKTPF
<i>E. chrysanthemi</i>	1	MLVNKFRVKQRVANLRWVSAAVMLSLTSL-HAWAFSIDDVAQKAEKLAEKGYEAPKSNLPAQFRDMKFFADYQQIRFNQDKSYWNSDQTPF
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> --- + + + + + </div>
<i>E. coli</i>	79	KLEFYHQGMYFDTPVKINEVTATAVKRIKYSPDYFTFGDVQHDKDTPVKDLGFAGFKVLYPINSKDKNDEIVSMLGASYFRVIGAGQVYGL
<i>P. syringae</i>	82	KVSFYHQGMHFDTPVKINEVTATRVEIKYDPNRFDFGDLKIDPKSTEKLGAGFRVLYPINKDDKQDEIMTMLGASYFRVIGKQVYGL
<i>E. chrysanthemi</i>	90	KLQFYHQGMYFDIPVKINEVTATEVNEIKYSTDYFNFGSVNHDPATVKDLGFAGFKVLYPINKADKHDEILSMLGASYFRVVGKQVYGL
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + + + + + + </div>
<i>E. coli</i>	169	SARGLAIDTALPSGEEFPRFKEFWIERPKPTDKRLTIYALLDSPRATGAYKFFVMPGRDTPVVDVQSKIYLRDKVGKLGVAPLTSMFLFGP
<i>P. syringae</i>	172	SARGMAIDTASPSGEEFPRFKEFWIEKPGDDNHLVIFALLDSPRATGAYQLTLRPGTNNLVVDVKSRMFLADKVNKLGVAPLTSMFLFGG
<i>E. chrysanthemi</i>	180	SARGLAIDTALPSGEEFPRFKEFWIEHPKPEDKHLVIYALLDSPRATGAYRFFVLYPGSDTMMDV EAKVYLRDKVGKLGVAITLSTSMFLFGP
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + + + + + + </div>
<i>E. coli</i>	259	NQPSANNYRPELHDSNGLSIHAGNGEWIWRPLNPNKHLAVSSFSMENPQGFGLLQGRDFSRFEDLDDRYDLRPSAWVTPKGEWKGKGSV
<i>P. syringae</i>	262	NQPSRVPNYRRELHDSNGLSIQAANGEWLWRPLNPNKHLSSIFLVENPRGFGLLQGRDFSQYEDLDDRYDKRPSAWIEPKGDWKGKGTV
<i>E. chrysanthemi</i>	270	NQPSPTLNYRPAHDSNGLSIHAGNGEWICGPLNPNKTLAVSTYTIENPKGFGLLQGRDFSGYEDLDDRYDLRPSGWIETKGDWKGKGV
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + + + + + + </div>
<i>E. coli</i>	349	ELVEIPTNDETNDNIVAYWTPDQLPEPGKEMNFKYTITFSRDEDKLHAPDNAWVQQTRRSTGDVKQSNLIRQPDGTIAFVVDFTGAEMKK
<i>P. syringae</i>	352	ELVEIPTADETNDNIVAYWKPETLAEPGQEMAFDYRLHWTMQENSIHSPDLGWVKQTQRSIGDVRQSNLIRQPDGSLAFLVDFVGPVLA
<i>E. chrysanthemi</i>	360	ELVEIPTADETNDNIVAFWTPENLPEKPKLEVYRLHFTKDEEALHSPEQAYVMQTMRSIGDVKQSNLIRQPDGTIAFVVDFTGAEMKK
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + + + + + + </div>
<i>E. coli</i>	439	LPEDTPVTAQTSIGDNGEIVESTVRYNPVTKGWRLVMRVKVKDAKKTTEMRAALVNAD-----
<i>P. syringae</i>	442	LPEDKTIKRSQVTTDDNVELVNNLRYNPVTKGYRLTLRVKVKDSSKPTTEMRAYLLREI PAEPGKEPALLVADKAEKKAKEAAKPAVS
<i>E. chrysanthemi</i>	450	LDPNTPIASQASIGDNGEIVENSRYNPVTHGWRLTLRMKVKDNKQPTTEMRAALVNGE-----
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + + + + + + </div>
<i>E. coli</i>		-----
<i>P. syringae</i>	532	KESANDQVEIAKADAPKPEAAKPETAKEAGKADAAGKGEVAKADAGKADASKAEAAKDKDGKEIQQPETEAPHTPEPAKTLIQVMTET
<i>E. chrysanthemi</i>		-----TTLTET
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> + </div>
<i>E. coli</i>	503	WSYQLPANE
<i>P. syringae</i>	622	WSYQLPSDE
<i>E. chrysanthemi</i>	514	WSYQLPANE

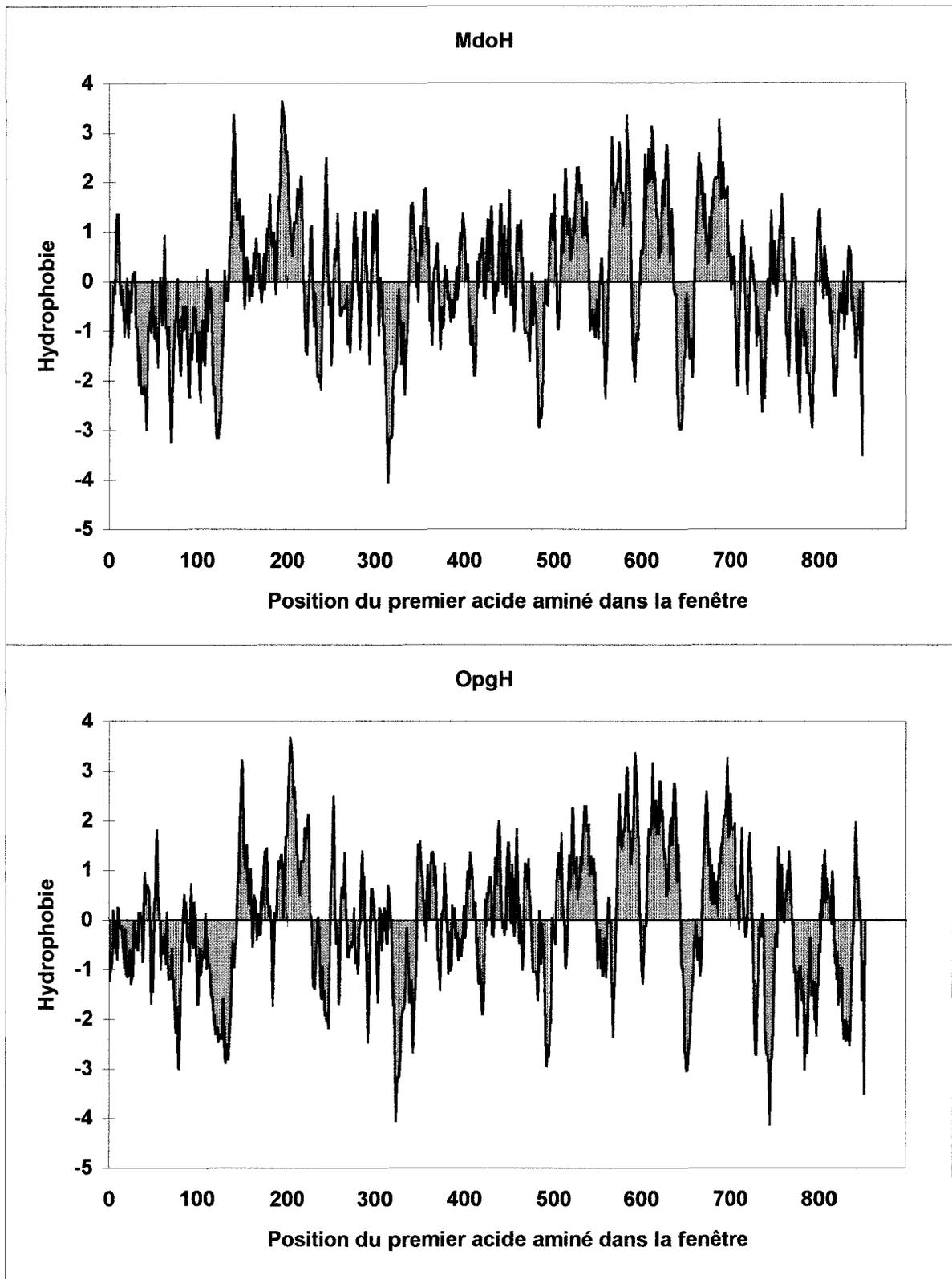


Figure 18 : Comparaison des profils d'hydrophobie des protéines MdoH et OpgH d'après la méthode de Kyte et Doolittle, avec une fenêtre de 7 acides aminés.

Les règles établies chez *E. coli* concernant l'initiation de la transcription sont les suivantes : 51% des transcrits sont initiés sur un ATP, 42% sur un GTP, 5% sur un CTP, et 2% sur un UTP. Au total, 93% des résidus initiaux sont des purines (von Hippel et coll., 1984). 2 sites potentiels d'initiation de la transcription sont présents à 7 pb (A, position 1) et 8 pb (G, position 2) en aval de la séquence -10 de *opgGH*.

L'identité de séquence nucléotidique dépasse largement les séquences promotrices, une forte similitude apparaissant dès la position -80 de *opgGH*, juste en aval d'une séquence répétée directe TTAAGCGCGTCAA TTAAGCGCGTCAA, absente dans *mdoGH*. Ainsi les 115 pb comprises entre la séquence répétée directe et le codon d'initiation de OpgG présentent elles 61% d'identité avec la région homologue de *mdoGH*.

b) Terminaison de la transcription

Une séquence répétée inversée de 14 pb est présente en aval de *opgH* (position 4315 à 4345, Figure 13 page 78). Au niveau de l'ARN messenger, la séquence GCAACGGCCAGUCCGUUGC est susceptible de former une structure en tige et boucle, suivie par 7 uridines. Une telle structure est caractéristique d'un terminateur de transcription intrinsèque (Platt, 1986 ; Yager et von Hippel, 1991 ; von Hippel et Yager, 1992). Le fait qu'un groupe de 5 adénines précède la région riche en G et C, suggère que ce terminateur peut être utilisé dans les 2 directions. La phase de lecture ouverte suivant et convergent vers *opgH*, homologue à l'*orf2* de *msyB*, se termine d'ailleurs 62 pb en aval de ce terminateur.

c) Usage des codons

Le pourcentage total en résidus cytosines plus guanines (GC%) pour *opgG* est égal à 52,3 % (816/1569), le GC% pour *opgH* est égal à 56 % (1445/2553) soit un GC% global (54,8 %) très proche de celui d'*E. chrysanthemi* (55,6 %). D'autre part, l'usage des codons de *opgGH* suit globalement celui d'*E. chrysanthemi* (Tableau 5 page 98). Organisation de la région aval de *opgGH*

La région située immédiatement en aval de *opgGH* est homologue à *msyB* d'*E. coli*, suppresseur extragénique en multicopie de la mutation *secY24*, mais dont la fonction est à ce jour inconnue (Ueguchi et Ito, 1992). Chez *E. coli*, le locus *msyB* est constitué de 2 phases ouvertes, *msyB* et *yceE*, vraisemblablement agencées en opéron de manière convergente par rapport à *mdoGH*. Or, chez *E. chrysanthemi* c'est l'homologue de *yceE*, et non celui de *msyB*, qui est situé immédiatement en aval de *opgGH* ; l'homologue de *msyB*, s'il existe, n'est donc pas organisé en opéron avec l'homologue de *yceE*.

La région située à partir du site *EcoRV* en aval de *opgGH* est homologue à *htrB*, codant une lauryl-transférase intervenant dans la biosynthèse du lipide A chez *E. coli* (Karow et Georgopoulos, 1991 ; Clementz et coll., 1996). L'orientation et la distance par rapport à *yceE* sont identiques chez les 2 espèces.

d) Organisation de la région amont de *opgGH*

Récemment, au laboratoire, Eric Lanfroy a montré que *mdoC*, codant la succinyl-transférase chez *E. coli*, est situé, de manière divergente, juste en amont de *mdoGH* (Lacroix et coll, résultats non publiés). Compte tenu de la très forte similitude existant entre *opgGH* et *mdoGH* et de la conservation de l'organisation chromosomique de la région en aval, il semblait probable que l'homologue de *mdoC* chez *Erwinia* soit situé en amont de *opgGH*.

Pour tester cette hypothèse, le R-prime P24 a été introduit par conjugaison dans la souche NFB1864 (*mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5*), puis les OPG ont été analysés par chromatographie sur couche mince après culture à différentes osmolarités. Cette expérience ne permettant pas de conclure quant à la complémentation de la mutation *mdoC1::Tn5*, le fragment *BamHI-BamHI* de 11,3 kb, chevauchant *opgGH* et détecté par hybridation moléculaire, a été cloné dans le vecteur pUC18. Afin de réduire la taille de l'insert, et d'éviter l'expression simultanée de *mdoG* et de *opgG*, une délétion par *EcoRI* a été effectuée. Le plasmide obtenu, pNFW87, contient un insert d'une taille de 7,1 kb couvrant une région jusqu'à 6,9 kb en amont de *opgGH*. Afin de déterminer si ce fragment permet de compléter la mutation *mdoC::Tn5*, le plasmide pNFW87 a été introduit dans la souche NFB1864. Une régulation osmotique de l'expression de l'homologue de *mdoC* étant possible, les OPG ont été extraits de cultures en milieu d'osmolarité élevée (de l'ordre de 400mosM). Après purification, les OPG ont été analysés par chromatographie d'échange d'anions (Figure 22 page 99). Aucune complémentation, même partielle, n'est observée.

La réalisation de fragments de séquence jusqu'à 3,5 kb en amont de *opgGH* n'a permis de retrouver aucune similitude dans les banques. La région amont de *opgGH* semble donc fortement remaniée par rapport à celle de *mdoGH*, et la séquence répétée directe présente en amont de *opgGH* pourrait constituer la « cicatrice » de réarrangements chromosomiques.

e) Comparaison avec *mdoGH* et *hrpM*

En accord avec les positions relatives dans l'arbre phylogénétique, la similitude des séquences protéiques est plus forte entre *opgGH* et *mdoGH* qu'entre *hrpM* et chacun des 2

autres locus (Tableau 6 page 100). Néanmoins, la similitude avec *hrpM* reste forte (80 %), ce qui suggère une forte pression de sélection, *a priori* incompatible avec l'absence de phénotype de croissance des mutants Mdo^- dans les conditions standards de laboratoire.

De même, l'organisation génétique globale de *opgGH* est plus proche de celle de *mdoGH* (Figure 23 page 100). *hrpM* diffère notamment par l'existence d'une région intergénique et par une séquence additionnelle, riche en lysine, alanine et acide glutamique, dans la région carboxy-terminale de l'homologue de OpgG. Cependant, les séquences adjacentes sont fortement remaniées, aussi bien en amont qu'en aval.

		<i>E. chrysanthemi</i>	<i>opgGH</i>
Ala A	GCA	11,1	8,7
	GCC	34,1	21,9
	GCG	36,9	33,5
	GCU	10,5	16,8
Arg R	AGA	1,6	2,2
	AGG	1,1	1,4
	CGA	2,8	2,2
	CGC	22,4	29,9
	CGG	8,5	4,4
	CGU	16,9	26,2
Asp D	GAC	25,0	19,7
	GAU	31,3	37,9
Asn N	AAC	31,4	19,0
	AAU	20,9	16,8
Cys C	UGC	4,6	5,1
	UGU	2,4	3,6
Glu E	GAA	28,0	34,3
	GAG	14,6	18,2
Gln Q	CAA	12,0	7,3
	CAG	34,6	29,9
Gly G	GGA	6,5	3,6
	GGC	45,2	29,9
	GGG	11,6	12,4
	GGU	19,6	15,3
His H	CAC	8,9	9,5
	CAU	10,0	16,8
Ile I	AUA	2,8	1,5
	AUC	27,9	22,6
	AUU	21,0	16,8
Leu L	UUA	6,0	0,7
	UUG	16,6	28,4
	CUA	1,9	2,9
	CUC	6,5	3,6
	CUG	59,5	73,6
	CUU	4,8	5,8

		<i>E. chrysanthemi</i>	<i>opgGH</i>
Lys K	AAA	28,6	24,0
	AAG	12,6	21,1
Met M	AUG	23,1	29,1
Phe F	UUC	19,8	29,1
	UUU	17,2	17,5
Pro P	CCA	3,9	2,9
	CCC	6,2	2,2
	CCG	24,5	43,0
	CCU	4,1	8,7
Ser S	AGC	26,7	16,0
	AGU	8,7	7,3
	UCA	6,3	7,3
	UCC	13,8	13,1
	UCG	14,5	10,9
Thr T	ACA	4,7	4,4
	ACC	34,7	20,4
	ACG	17,9	14,6
	ACU	5,2	8,0
Trp W	UGG	15,7	29,2
Tyr Y	UAC	16,0	12,4
	UAU	16,9	19,0
Val V	GUA	9,2	8,7
	GUC	17,4	12,4
	GUG	33,4	27,7
	GUU	9,5	17,5
STOP	UAA	1,4	0,7
	UAG	0,3	0,0
	UGA	1,2	0,7

Tableau 5 : Fréquence d'utilisation des codons en % pour l'opéron *opgGH* et pour l'ensemble des séquences codantes disponibles d'*E. chrysanthemi* (38113 codons, serveur CUTB, Codon Usage Tabulated from Genbank). La fréquence la plus élevée pour chaque acide aminé est grisée.

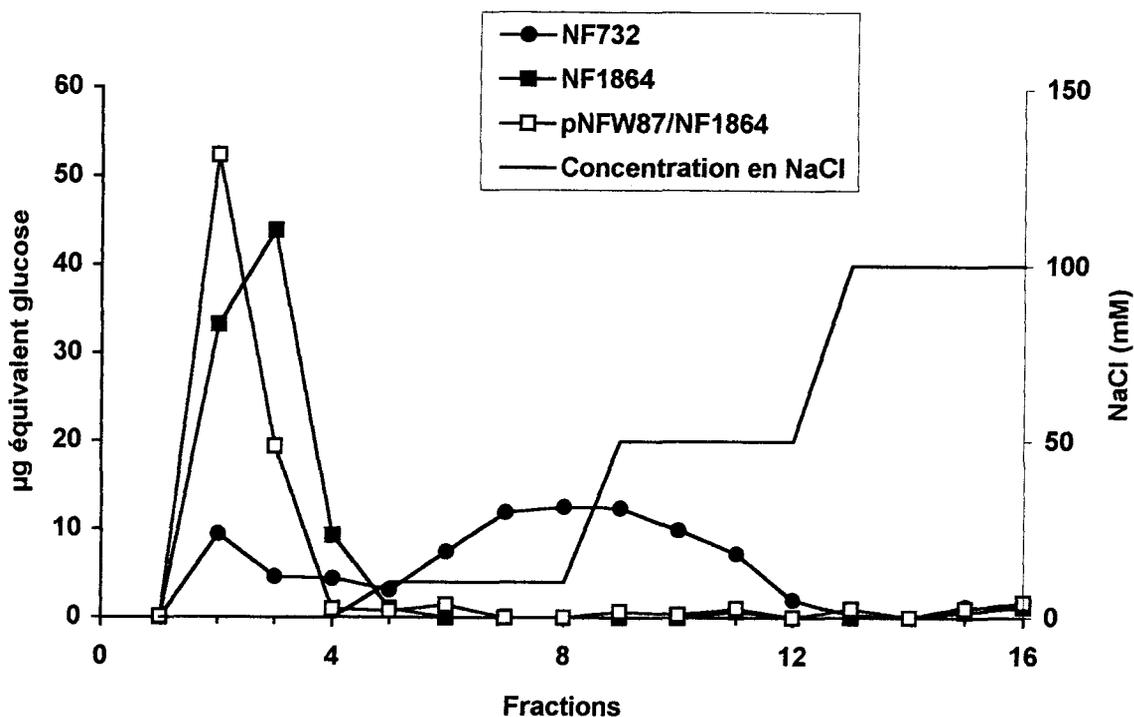
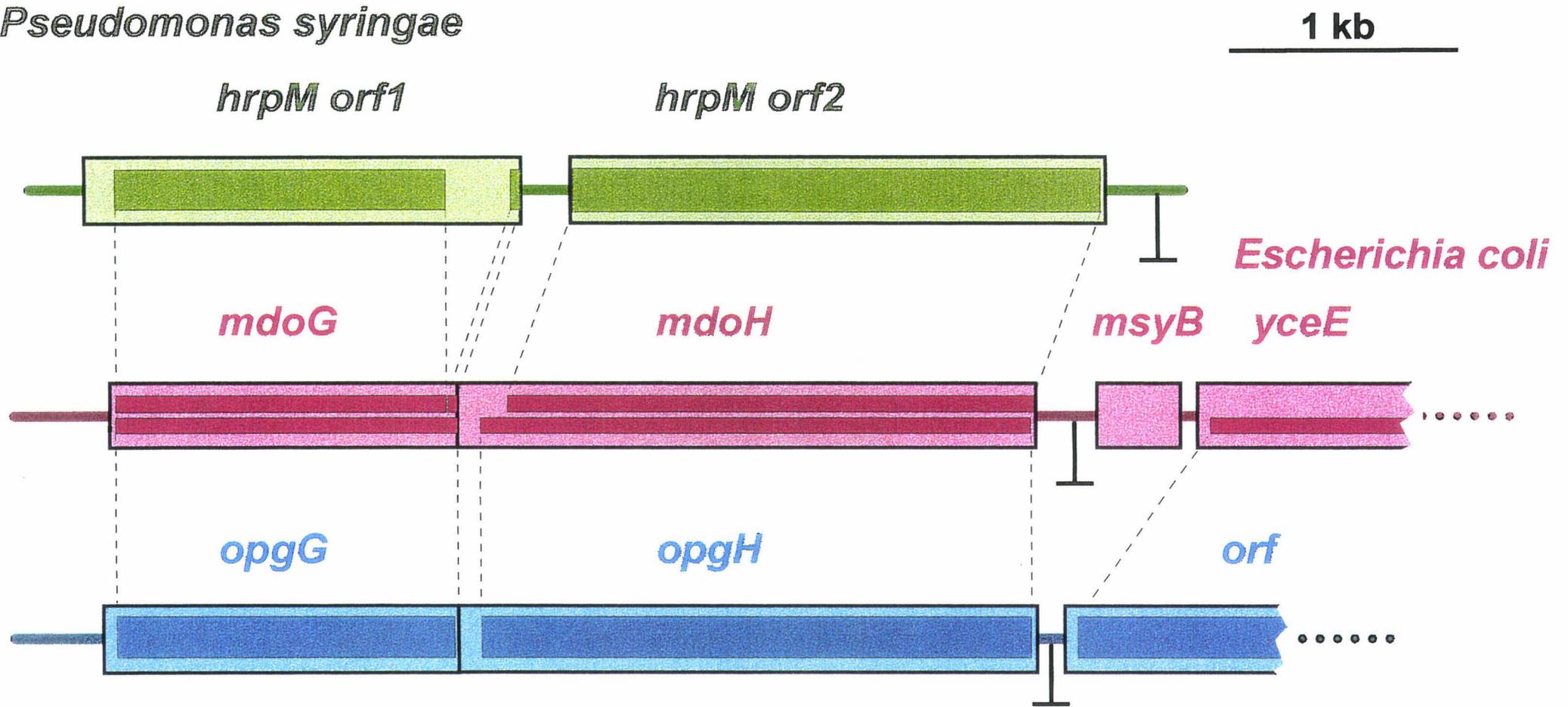


Figure 22 : Chromatographie d'échange d'anions sur colonne de DEAE-Sephadex A25 (6 ml) de 100 µg d'OPG purifié à partir de culture en milieu LB ajusté à 0,15 M NaCl des souches NFB732 (*mdoB214::Tn10*), NFB1864 (*mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5*) et pNFW87/NFB1864. Les OPG sont élués par des concentrations croissantes de NaCl en fractions de 1,5 ml. La quantité d'oligosaccharide est déterminée par la méthode à l'antrone et exprimée en µg d'équivalent glucose.

	Identité	Similitude
MdoG / OpgG	75,5 % (386/511)	87,5 % (447/511)
MdoG / Orf1	65,3 % (333/510)	79,4 % (405/510)
OpgG / Orf1	64,6 % (345/534)	78,5 % (419/534)
<hr/>		
MdoH / OpgH	74,7 % (625/829)	85,8 % (711/829)
MdoH / HrpM	66,7 % (520/780)	81,7 % (637/780)
OpgH / HrpM	68,1 % (524/769)	81,0 % (623/769)
<hr/>		
<i>mdoGH / opgGH</i>	75,4 % (1011/1340)	86,4 % (1158/1340)
<i>mdoGH / hrpM</i>	66,1 % (853/1290)	80,8 % (1042/1290)
<i>opgGH / hrpM</i>	66,7 % (869/1303)	80,0 % (1042/1303)

Tableau 6 : Similitudes de séquences des opérons *mdoGH*, *opgGH* et *hrpM*.

Pseudomonas syringae



Erwinia chrysanthemi

Figure 23 : Comparaison de l'organisation génétique globale des opérons *hrpM*, *mdoGH* et *opgGH*. Les rectangles noirs représentent les phases codantes, les blocs plus foncés les zones d'homologie. Les terminateurs de transcription sont également représentés.

C. CONSTRUCTION DE MUTANTS PAR GENETIQUE INVERSE

1. INSERTION DE LA CASSETTE *uidA-Kan^R*

La cassette *uidA-Kan^R* (Bardonnnet et Blanco, 1992) a été obtenue à partir du plasmide pUIDK11 digéré par *SphI*, puis insérée au site *SphI* de *opgG* ainsi qu'au premier site *SphI* de *opgH* (Figure 24 page 103). Cette cassette comporte le gène *uidA* avec sa séquence de Shine-Dalgarno. Son insertion, dans la bonne orientation, permet d'inactiver un gène tout en générant une fusion transcriptionnelle. Ces 2 constructions ont ensuite été reportées sur le chromosome par échange d'allèle. La recombinaison a été confirmée par hybridation moléculaire en utilisant le fragment *SalI-SalI* de 3,3 kb comme sonde.

2. IMPACT DES MUTATIONS *opgG::uidA* ET *opgH::uidA* SUR LA SYNTHÈSE D'OPG

Les souches EC3937, NFB3500 (*opgG::uidA*) et NFB3501 (*opgH::uidA*) ont été cultivées une nuit en milieu LB sans NaCl, et leur contenu en glucanes a été extrait selon la méthode au TCA. Le profil chromatographique sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 est représenté Figure 25 page 103. Les souches NFB3500 et NFB3501 présente une disparition totale du pic N°2, correspondant aux OPG ; le pic N°1 étant constitué par des exopolysaccharides et par des fragments de lipopolysaccharide, et le pic N°3 étant constitué par des monosaccharides et des disaccharides.

3. CARTOGRAPHIE GENETIQUE DE *opgGH*

Le locus *opgGH* a été cartographié en utilisant la résistance à la kanamycine de la fusion *opgG::uidA* comme marqueur. Le pourcentage de cotransduction avec *ura-2* (souche A1383) par le phage ϕ EC2 est de 80%. Le locus *ura*, localisé à environ 20 minutes sur le chromosome d'*E. chrysanthemi* 3937 (Lojkowska et coll., 1995), est donc vraisemblablement l'homologue de *pyrC* d'*E. coli* utilisé pour le clonage.

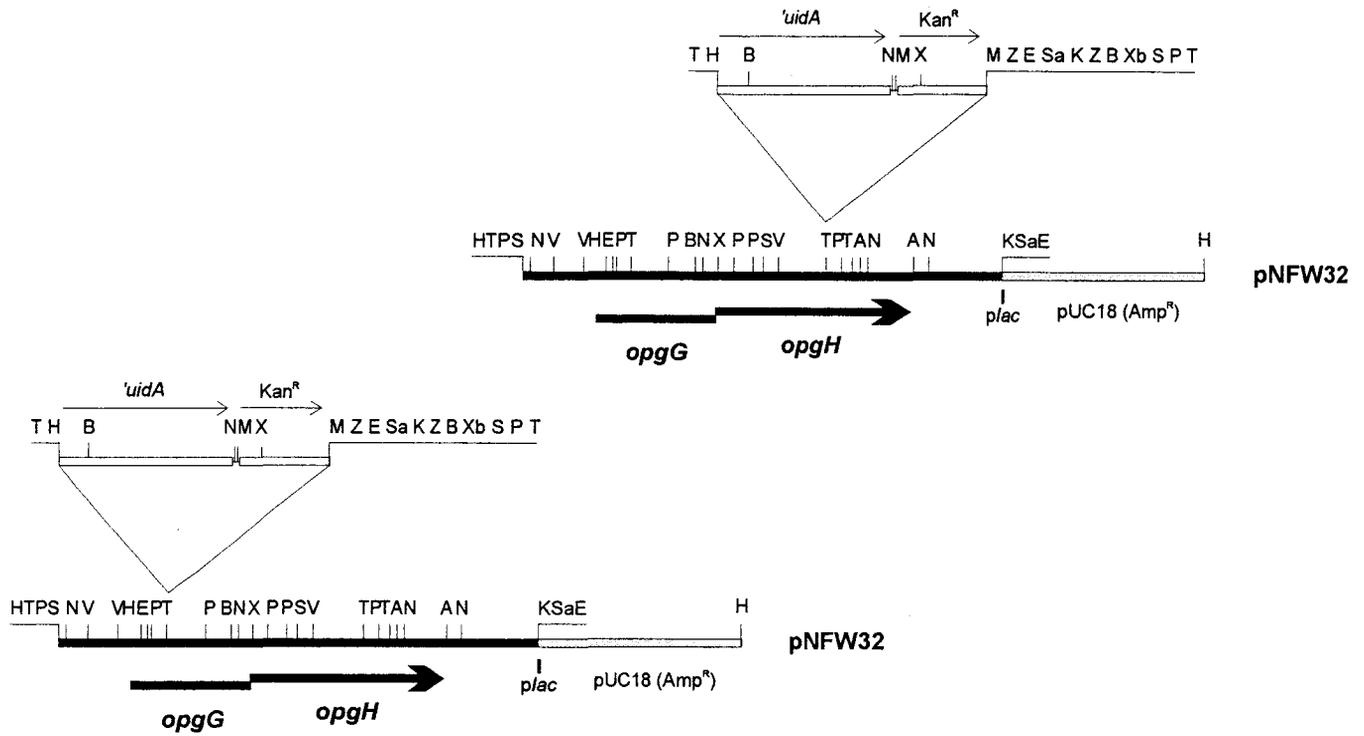


Figure 24 : Inactivation de *opgGH* par insertion de la cassette '*uidA*-Kan. A, *AgeI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *HindIII* ; K, *KpnI* ; M, *MluI* ; N, *NcoI* ; P, *PstI* ; S, *SaI* ; Sa, *SacI* ; T, *SphI* ; V, *EcoRV* ; X, *XhoI* ; Xb, *XbaI* ; Z, *SmaI*. La cassette '*uidA*-Kan est issue du plasmide pUIDK11 digéré par *SphI*. Une digestion partielle de pNFW32 par *SphI* permet d'insérer la cassette dans *opgG* et dans *opgH*.

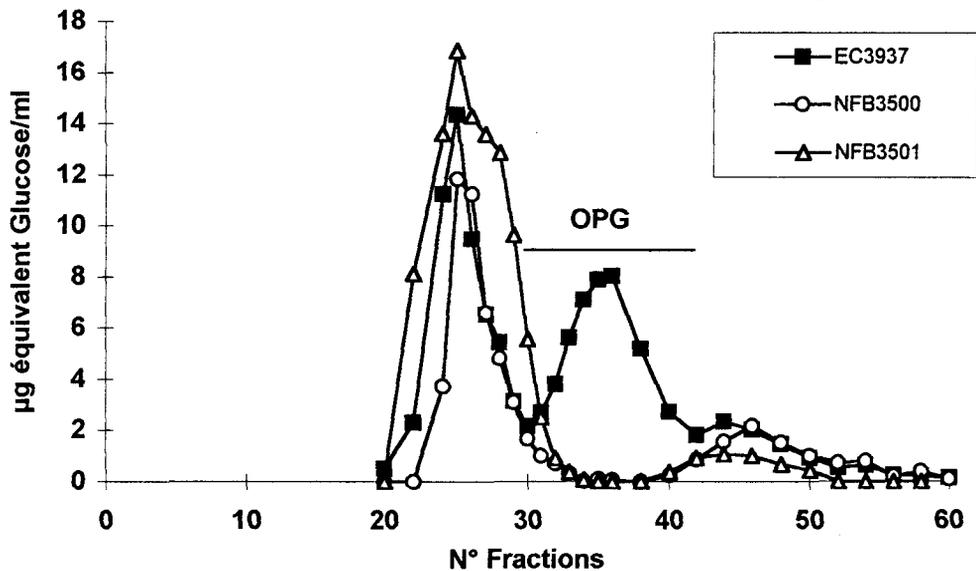


Figure 25 : Profil chromatographique sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 des OPG extraits après culture en milieu LB sans NaCl des souches EC3937, NFB3500 (*opgG::uidA-Kan^R*) et NFB3501 (*opgH::uidA-Kan^R*). Les fractions ont un volume de 1,5 ml. La quantité d'oligosaccharide est déterminée par la méthode à l'antrone et exprimée en µg d'équivalent glucose pour 1 ml de chaque fraction pour 100 ml de culture à DO (620 nm)=1.

4. EXPRESSION DES FUSIONS *opgG::uidA* et *opgH::uidA*

L'activité des fusions transcriptionnelles *opgG::uidA* et *opgH::uidA* a été mesurée à basse et à haute osmolarité en phase exponentielle de croissance en milieu LB et en milieu LOS (Tableau 7 page 107). Dans tous les cas, l'activité des fusions n'est que très faiblement augmentée à basse osmolarité. La régulation osmotique de la biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* ne semble donc pas être de type transcriptionnel, à moins que celle-ci nécessite la présence des protéines OpgG et OpgH. L'expression de *opgH::uidA* est sensiblement plus élevée que celle de *opgG::uidA*. Cette différence d'expression entre les 2 fusions correspond vraisemblablement à l'activité du promoteur secondaire permettant la complémentation de la mutation *mdoH200::Tn10* par pNFW1 (voir paragraphe I.B.1. page 72). Si tel est le cas, l'activité de ce promoteur n'est pas négligeable puisqu'elle représenterait alors 8% de l'activité du promoteur de *opgGH* en milieu LOS et de l'ordre de 35% dans les autres conditions. Cependant, du fait du couplage traductionnel existant entre *opgG* et *opgH*, la contribution effective de ce promoteur à l'expression de OpgH est sans doute faible puisqu'aucune séquence de Shine-Dalgarno n'est présente en amont du codon d'initiation de OpgH.

D. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MUTANTS *opg* D'*E. chrysanthemi*

1. CROISSANCE

Si les mutants *opg* d'*E. chrysanthemi* ne présentent pas de phénotype de croissance en milieu LB ou 63, leur croissance est affectée en milieu LOS (Figure 26A page 106). Afin de déterminer si ce phénotype de croissance est lié à des conditions de basse osmolarité, les mutants *opg* ont été cultivés dans le même milieu ajusté à 100 mM NaCl. Aucune différence de croissance n'est alors observée entre les mutants *opg* et la souche sauvage (Figure 26B page 106). L'élévation de l'osmolarité (de 70 à 270 mosM) suffit donc à elle seule à supprimer le phénotype de croissance des mutants *opg*.

Les mutants *opg* se caractérisent également par une altération de la morphologie cellulaire. Les cellules sont plus petites et plus rondes en milieu LB et sous forme de filaments gigantesques en milieu 63. Ces caractéristiques semblent dépendre non seulement

des conditions de culture (en particulier osmolarité), mais aussi de la nature de l'inoculum. Ainsi, la formation de filaments ne s'observent en milieu 63 que si l'inoculum est constitué de bactéries cultivées en milieu LB.

2. HYPERSENSIBILITE AUX SELS BILIAIRES

Contrairement aux mutants d'*E. coli* et à une souche Opg^+ , les mutants *opg* d'*E. chrysanthemi* sont incapables de croître en colonies isolées sur milieu Mac Conkey. La CMI (concentration minimale inhibitrice) en sels biliaires est respectivement de 2,3 et 2,8 g/l pour NF3500 (*opgG::uidA*) et NF3501 (*opgH::uidA*) alors qu'elle est de 18,3 g/l pour la souche sauvage (Figure 27 page 107). La concentration en sels biliaires du milieu Mac Conkey étant inférieure à la MIC des mutants *opg* (1,5 g/l), il apparaît que les mutants *opg* sont également hypersensibles au crystal violet présent dans le milieu Mac Conkey.

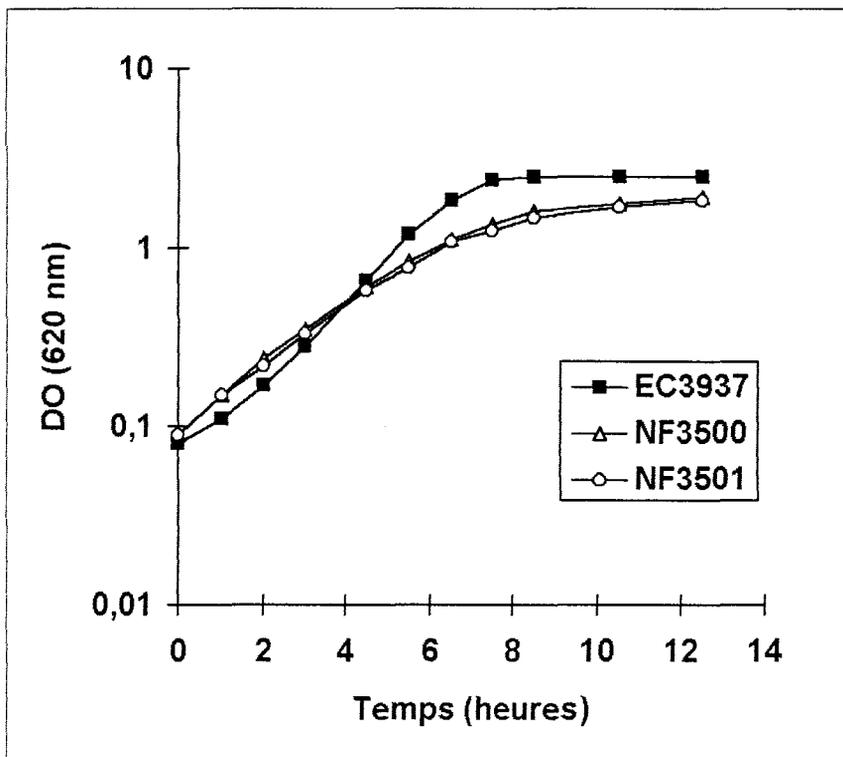
3. HYPERPRODUCTION D'EPS

Les mutants *opg* d'*E. chrysanthemi*, tout comme ceux d'*E. coli*, se distinguent par leur caractère muqueux. Afin de quantifier l'impact des mutations *opg* sur l'expression des gènes de biosynthèse des exopolysaccharides, la mutation *opgG::uidA* a été transduite dans la souche A2575 (*epsG::lacZ*) et l'activité de la fusion *epsG::lacZ* mesurée en phase stationnaire en milieu 63 en utilisant soit du glycérol soit du glucose comme source de carbone (Tableau 8 page 108). Dans ces deux conditions, l'expression de la fusion *epsG::lacZ* est augmentée d'un facteur 3 dans un contexte Opg^- .

4. MOTILITE

Chez *E. coli* et chez les Rhizobiacées, les mutants Opg^- présentent une motilité réduite accompagnée d'une réduction du nombre de flagelles. Afin de déterminer si cette observation est généralisable à *E. chrysanthemi*, la motilité des mutants *opg* a été testé sur boite LB gélosé à 0,4% (Figure 28 page 108). Ces mutants sont effectivement déficients dans la motilité puisque après 24 heures d'incubation à 30°C, le diamètre des halos est respectivement de 0,75 et 0,20 cm pour les mutants *opgG::uidA* et *opgH::uidA* alors qu'il est de 2,25 cm pour la souche sauvage. Le fait que le phénotype non motile soit plus marqué chez le mutant *opgH* suggère que la mutation *opgG* n'est pas polaire, vraisemblablement grâce à l'activité du promoteur secondaire de *opgGH* et/ou à l'expression de *opgH* à partir de la cassette Kan^R.

A



B

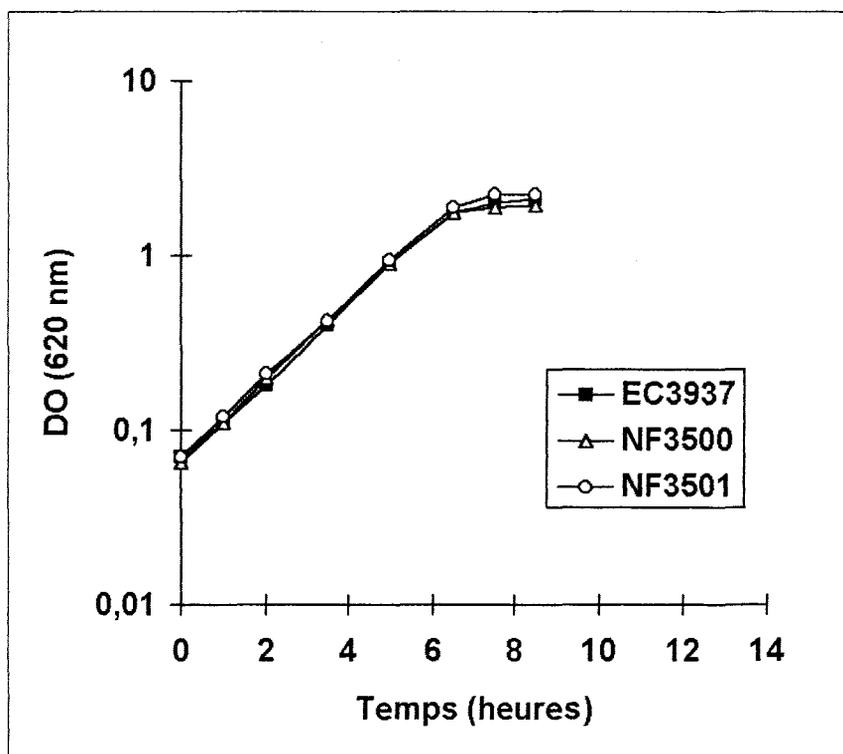


Figure 26 : Osmosensitivité de la croissance des mutants *opg* et remédiation par adjonction d'osmolyte. Les bactéries EC3937 (Opg^+), NF3500 (*opgG::uidA*) et NF3501 (*opgH::uidA*) sont cultivées en milieu LOS (A) ou en LOS ajusté à 100 mM NaCl (B) à partir de précultures dans les mêmes milieux.

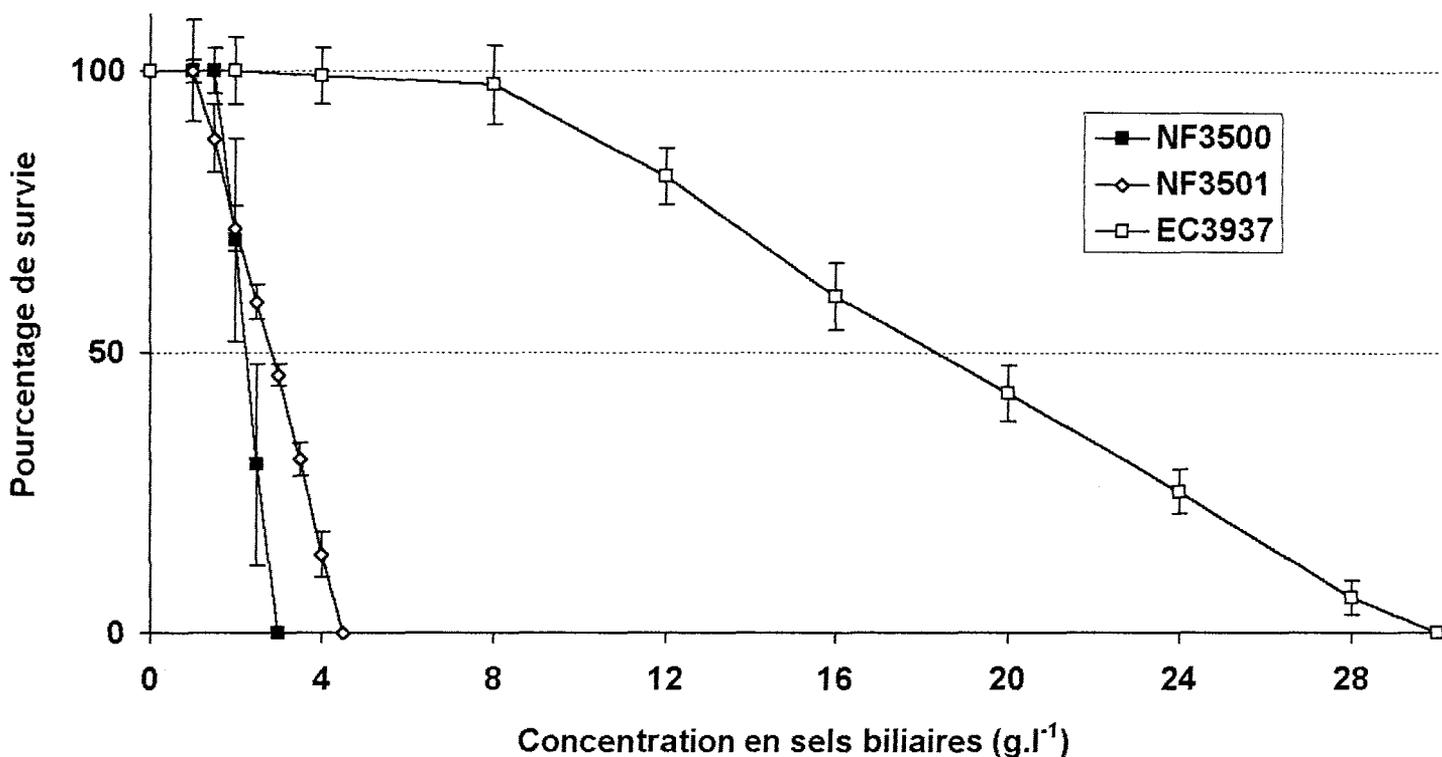


Figure 27 : Détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice) en sels biliaires des souches EC3937 (Opg^+), NF3500 ($opgG::uidA$) et NF3501 ($opgH::uidA$). Entre 200 et 300 UFC (unité formatrice de colonies) sont étalées sur des boîtes de milieu LB contenant des concentrations variables de sels biliaires. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport à un étalement sur milieu LB.

Souches	Conditions de croissance			
	LB sans NaCl	LB 0,3M NaCl	LOS	LOS + 0,3M NaCl
NFB3500 (<i>opgG::uidA</i>)	1742	1457	2764	1987
NFB3501 (<i>opgH::uidA</i>)	2395	1948	2978	2687

Tableau 7 : Effet de l'osmolarité sur l'expression de l'opéron *opgGH* (unité arbitraire). Les dosages sont effectués sur des bactéries en phase exponentielle de croissance, les valeurs correspondent à la moyenne de 3 dosages indépendants.

Souches	Conditions de croissance	
	M63 Glycérol	M63 Glucose
A2575 (<i>epsG::lacZ</i>)	20	52
NFB3511 (<i>epsG::lacZ opgG::uidA</i>)	63	182

Tableau 8 : Impact des mutations *opg* sur l'expression des gènes de biosynthèse des exopolysaccharides. Les résultats sont exprimés en nmol de produit libéré par minute et par mg de poids sec et correspondent à la moyenne de 3 dosages indépendants.



Figure 28 : Réduction de la motilité des mutants *Opg⁻* d'*E. chrysanthemi*. Une boîte de milieu LB gélosé à 0,4% est inoculée au cure-dent et incubée 24 h à 30°C. En haut EC3937 (*Opg⁺*) ; en bas à gauche NF3500 (*opgG::uidA*) ; en bas à droite NF3501 (*opgH::uidA*). L'expérience a été répétée indépendamment 5 fois avec le même résultat.

5. PRODUCTION DES EXOENZYMES

a) Excrétion des pectate-lyases

Afin d'étudier l'impact des mutations *opg* sur la production et l'excrétion des pectate-lyases, la mutation *opgG::uidA* a été transduite dans les souches A1703 (*pelE::lacZ*), A1706 (*pelC::lacZ*) et A655 (*outC::lacZ*). La production de pectate-lyases des souches ainsi construites et des souches NFB3500 (*opgG::uidA*) et NFB3501 (*opgH::uidA*) a d'abord été estimée sur boîte de milieu 63 contenant à la fois du polygalacturonate et du glycérol (Figure 29 page 110). Les mutants Opg^- se caractérisent par une absence complète de halo de dégradation du polygalacturonate, et donc par une déficience d'excrétion des pectate-lyases. Par contre, lorsque le même test est réalisé sur boîte de milieu 63 contenant uniquement du polygalacturonate (Figure 30 page 110), la taille du halo n'est que sensiblement réduite chez les mutants Opg^- . Cette différence de comportement est strictement dépendante de la source de carbone présente en plus du polygalacturonate. Ainsi, aucun halo n'est observé en présence de saccharose ou de glucose alors qu'un halo de taille réduite est observé en présence de succinate ou de galacturonate.

En milieu liquide, en conditions induites, l'activité pectate-lyase est réduite d'un facteur 3 à 5 dans un contexte Opg^- (Tableau 9 page 111). La mutation *opgG::uidA* semble également perturber l'intégrité de l'enveloppe puisque seule une faible partie de l'activité (de l'ordre de 10 %) est liée aux cellules chez le mutant *outC opgG*, contre 90 % chez le mutant *outC*. La « fuite » d'exoenzymes se produit vraisemblablement lors de la centrifugation puisque le mutant *outC opgG* est, tout comme le mutant *outC*, incapable de croître en présence de polygalacturonate comme seule source de carbone.

b) Excrétion des cellulases

L'activité cellulase des mutants Opg^- est fortement réduite, la taille du halo obtenu étant similaire à celle du halo produit par un mutant *outC* (Figure 31 page 111). L'absence d'OPG perturbe donc suffisamment la biogenèse ou le fonctionnement du système Out pour affecter fortement l'excrétion des cellulases et des pectate-lyases.



Figure 29 : Test sur boîte de milieu 63 + glycérol + polygalacturonate de la production de pectate-lyases par les mutants Opg^- . De gauche à droite et de haut en bas : NFB3500 (*opgG::uidA*) ; EC3937 (sauvage) ; NFB3501 (*opgH::uidA*) ; A1703 (*pelE::lacZ*) ; A655 (*outC::lacZ*) ; A1706 (*pelC::lacZ*) ; NFB3502 (*pelE::lacZ Opg^-*) ; NFB3504 (*outC::lacZ Opg^-*) ; NFB3503 (*pelC::lacZ Opg^-*).



Figure 30 : Test sur boîte de milieu 63 + polygalacturonate de la production de pectate-lyases par les mutants Opg^- . De gauche à droite et de haut en bas : NFB3500 (*opgG::uidA*) ; EC3937 (sauvage) ; NFB3501 (*opgH::uidA*) ; NFB3502 (*pelE::lacZ Opg^-*) ; NFB3503 (*pelC::lacZ Opg^-*) ; A1703 (*pelE::lacZ*) ; A1706 (*pelC::lacZ*).

Conditions de culture	<i>pelE::lacZ</i>		<i>pelC::lacZ</i>		<i>outC::lacZ</i>	
	+	<i>opg</i>	+	<i>opg</i>	+	<i>opg</i>
63	0,08	0,08	0,08	0,06	-	-
63 + polygalacturonate + extrait de chrysanthème + CaCl ₂	5,62	1,01	0,65	0,24	0,16	0,03
63 + galacturonate	22,32	8,39	1,54	0,46	0,06	0,05

Tableau 9 : Production de pectate-lyases (activité spécifique) chez les mutants *opg*. Les cultures sont réalisées en milieu 63 + glycérol (2 g.l⁻¹) à 30°C jusqu'en phase stationnaire tardive, en absence ou en présence d'inducteur (polygalacturonate (4 g.l⁻¹) + extrait de chrysanthème (0,4 % v/v) + CaCl₂ (1 mM) ou galacturonate (2 g.l⁻¹)). Les résultats (moyenne de 3 dosages indépendants) sont exprimés en µmol de produit libéré par min et par mg de poids sec bactérien.

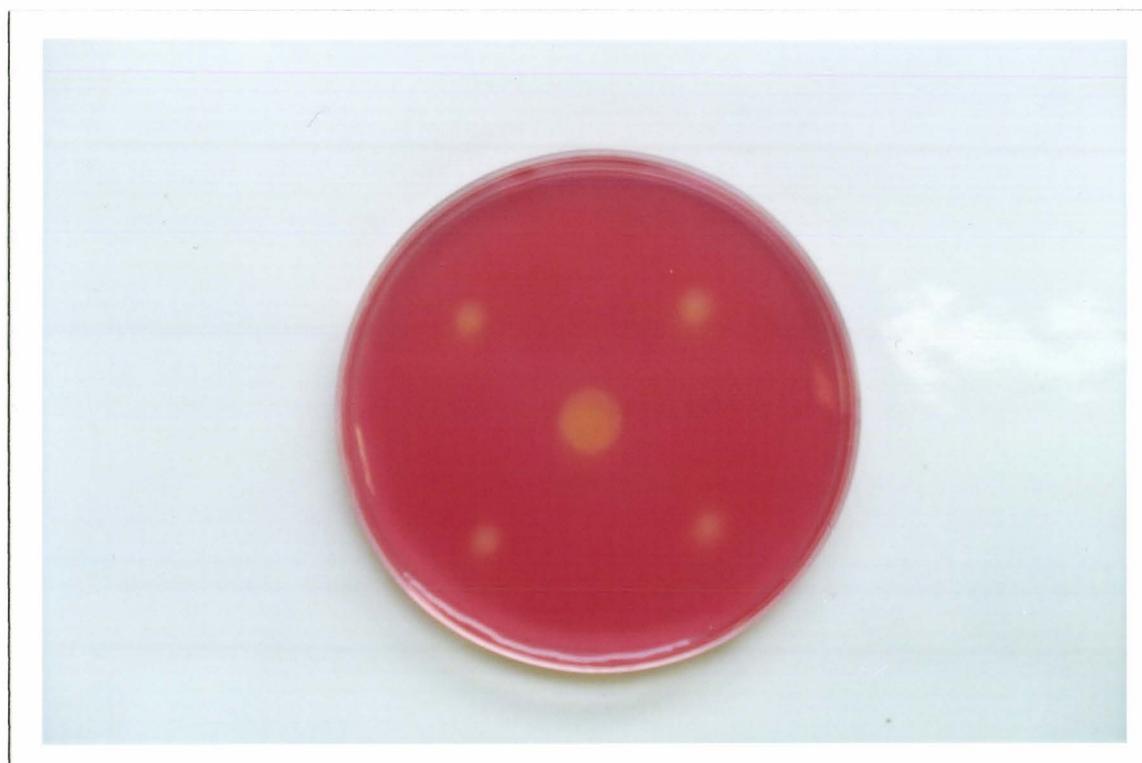


Figure 31 : Test sur boîte de milieu 63 + glycérol + carboxyméthylcellulose de la production de cellulases par les mutants *Opg*⁻. Au centre EC3937 (sauvage) ; en haut à gauche NFB3500 (*opgG::uidA*) ; en haut à droite NFB3501 (*opgH::uidA*) ; en bas à gauche A655 (*outC::lacZ*) ; en bas à droite NFB3504 (*outC::lacZ Opg*⁻).

c) Excrétion des protéases

Les mutants *opg* ne produisent aucune activité protéase détectable sur boîte (Figure 32 page 113). L'absence d'OPG perturbe donc également la biogenèse ou le fonctionnement du système de transport des protéases, alors que ce système de sécrétion (transporteur de type ABC) est totalement différent du système Out (système de sécrétion de type II).

d) Expression des gènes *pel* et *out*

La mutation *opgG::uidA* affecte l'expression des gènes *pel* en conditions induites (Tableau 10 page 113). L'expression de la fusion *pelC::lacZ* est réduite d'un facteur 2 et celle de la fusion *pelE::lacZ* d'un facteur 8. De même, l'expression de la fusion *outC::lacZ* est réduite d'un facteur 2 quelles que soient les conditions de croissance. Deux mécanismes par lesquels l'absence d'OPG provoque une diminution de la transcription des gènes *pel* et *out* sont envisageables. D'une part, la mutation *opg* pourrait affecter le réseau de régulation pour partie commun aux gènes *pel* et *out*, par exemple en perturbant le fonctionnement du couple PecS/PecM qui régule à la fois *pelC*, *pelE* et *outC*. D'autre part, la mutation *opg* pourrait affecter suffisamment l'export des protéines PelC, PelE et tout ou partie des protéines du système Out pour qu'il s'exerce une rétroaction négative sur leur expression.

Dans un contexte *Opg*⁺, l'expression des fusions *pelE::lacZ* et *pelC::lacZ* est plus forte sur milieu 63 gélosé + PGA qu'en milieu 63 gélosé + PGA + glycérol (Tableau 10 page 113). De même, l'expression de ces fusions chez le mutant *opg* est très faible sur milieu 63 + PGA + glycérol (conditions dans lesquelles aucun halo n'est observé) et est sensiblement augmentée en absence de glycérol (conditions dans lesquelles un halo est observé), en particulier celle de la fusion *pelE::lacZ*. La différence d'excrétion des pectate-lyases observée sur boîte chez les mutants *opg* selon que du glycérol soit présent ou non est donc directement corrélée à une différence d'expression des gènes *pel*, qui semble trop faible en présence de glycérol pour qu'un halo puisse être observé.

6. VIRULENCE

a) Impact des mutations *opg* sur la virulence d'*E. chrysanthemi*

Les mutants *opg* sont totalement avirulents, aucun symptôme n'est observé lors d'infection de feuilles d'endives ou de tubercules de pomme de terre (Figure 33 page 115), même après une incubation prolongée (jusqu'à 10 jours).



Figure 32 : Test sur boîte de milieu LB + lait (0,4 %) de la production de protéases par les mutants *Opg*⁻. En haut EC3937 (sauvage) ; en bas à gauche NFB3500 (*opgG::uidA*) ; en bas à droite NFB3501 (*opgH::uidA*).

	<i>pelE::lacZ</i>		<i>pelC::lacZ</i>		<i>outC::lacZ</i>	
	+	<i>opg</i>	+	<i>opg</i>	+	<i>opg</i>
63 + glycérol	11	4	4	3	122	68
63 + glycérol + polygalacturonate + extrait de chrysanthème + CaCl ₂	80	13	297	131	146	46
63 gélosé + polygalacturonate + glycérol	145	16	272	16	ND	ND
63 gélosé + polygalacturonate	248	58	810	872	ND	ND
63 + glycérol + galacturonate	272	41	612	381	173	77

Tableau 10 : Expression des fusions *pelE::lacZ*, *pelC::lacZ* et *outC::lacZ* (activité spécifique) chez les mutants *opg*. Les cultures sont réalisées en milieu 63 + glycérol (2 g.l⁻¹) à 30°C jusqu'en phase stationnaire tardive, en absence ou en présence d'inducteur (polygalacturonate (4 g.l⁻¹) + extrait de chrysanthème (0,4 % v/v) + CaCl₂ (1 mM) ou galacturonate (2 g.l⁻¹)). Les résultats (moyenne de 3 dosages indépendants) sont exprimés en nmol de produit libéré par minute et par mg de poids sec bactérien.

b) Coinfection de tubercules de pomme de terre

Chez les mutants *opg*, l'expression des gènes *pel* reste inductible par le polygalacturonate et le galacturonate (Tableau 9 page 111) et les mutants *opg* sont capables de croître en présence de polygalacturonate comme seule source de carbone. Cependant, il est possible qu'*in planta* le niveau basal d'excrétion de pectinases par les mutants *opg* ne soit pas suffisant pour permettre la production d'inducteur et donc pour induire la production des protéines impliquées dans la pectinolyse. Pour tester cette hypothèse, des expériences de coinfection avec une souche sauvage ont été réalisées sur des tubercules de pomme de terre en utilisant différentes proportions de bactéries sauvages (Figure 34 page 116). La présence de bactéries sauvages permet la croissance d'un mutant *outS*, même en très faible proportion (1%). Il est donc possible de « compléter » le défaut d'excrétion des pectinases et de permettre la croissance *in planta* d'un mutant défectueux pour la production d'exoenzymes en fournissant celles-ci au sein du tissu végétal. En revanche, la présence d'une souche sauvage ne permet pas au mutant *opg* de croître, et ce quelle que soit la proportion de bactéries sauvages inoculées (jusqu'à 90%), alors que la croissance des mutants *opg* n'est pas inhibée lors de coinoculations réalisées dans les mêmes proportions en milieu 63. Les mutants *opg* sont néanmoins viables puisque le nombre estimé de bactéries Kan^R au sein de l'ensemble du tissu macéré est similaire au nombre de bactéries Kan^R présente dans l'inoculum. Enfin, l'observation au microscope du tissu macéré a montré que les mutants *opg* ne forme pas de filaments dans ces conditions et donc que le nombre de bactéries Kan^R n'est pas sous-estimé.

c) Impact de la carence en fer sur la croissance des mutants *opg*

Comme les fluides végétaux extracellulaires sont perçus comme un milieu carencé en fer (Masclaux et Expert, 1995), l'impact de la carence en fer sur la croissance des mutants *opg* a été examiné. En milieu 63 carencé en fer, la croissance de la souche NFB3500 (*opgG::uidA*) est identique à celle d'une souche sauvage (Figure 35 page 117). Le défaut de croissance observé *in planta* des mutants *opg* n'est donc pas dû à une déficience de l'assimilation du fer.

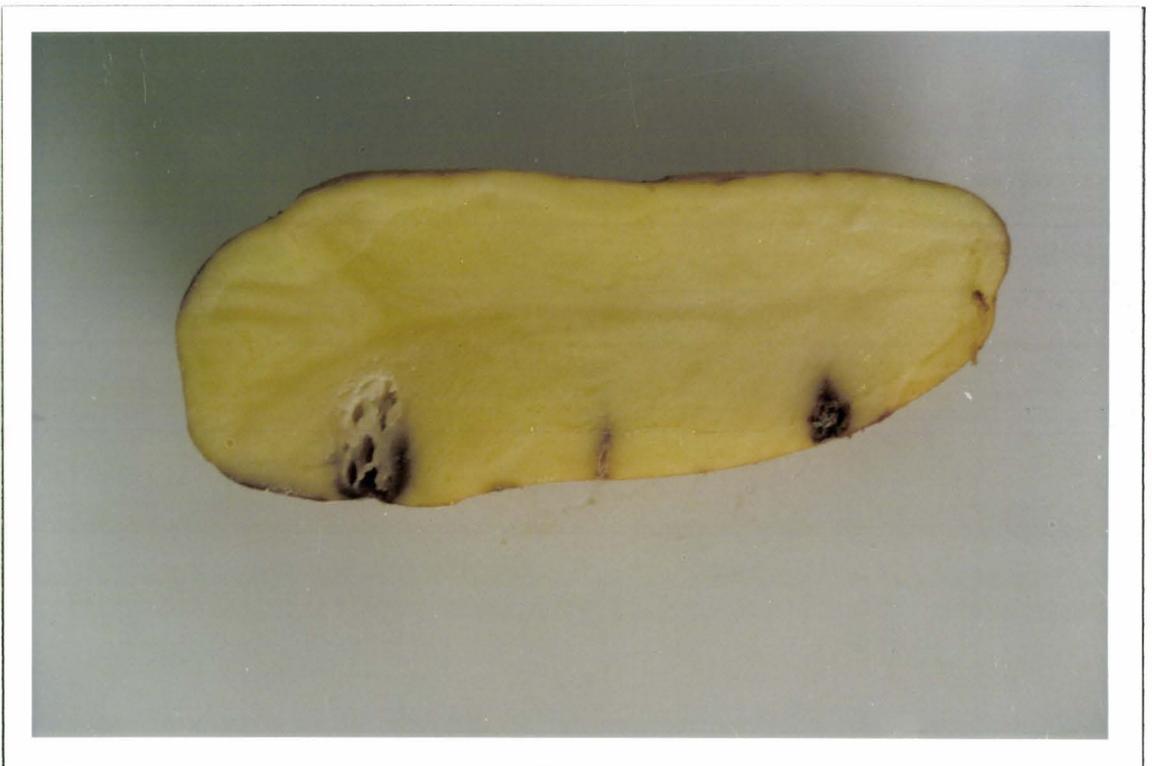
A**B**

Figure 33 : Macération des tissus végétaux par *E. chrysanthemi*. **A** : 10^6 bactéries des souches NFB3500 (*opgG::uidA*, à gauche) EC3937 (sauvage, au centre) et NFB3501 (*opgH::uidA*, à droite) sont inoculées sur des feuilles d'endives scarifiées. **B** 10^7 bactéries des souches EC3937 (sauvage, à gauche) NFB3500 (*opgG::uidA*, au centre) et A3144 (*outS::Kan*, à droite) sont inoculées dans des trous faits dans des tubercules de pomme de terre. Les symptômes sont examinés après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C pour les feuilles d'endives et après 48 à 72 heures d'incubation pour les tubercules de pomme de terre. Chaque test, réalisé sur 6 feuilles ou tubercules, est répété au moins 3 fois. Des symptômes similaires sont obtenus de manière reproductible.

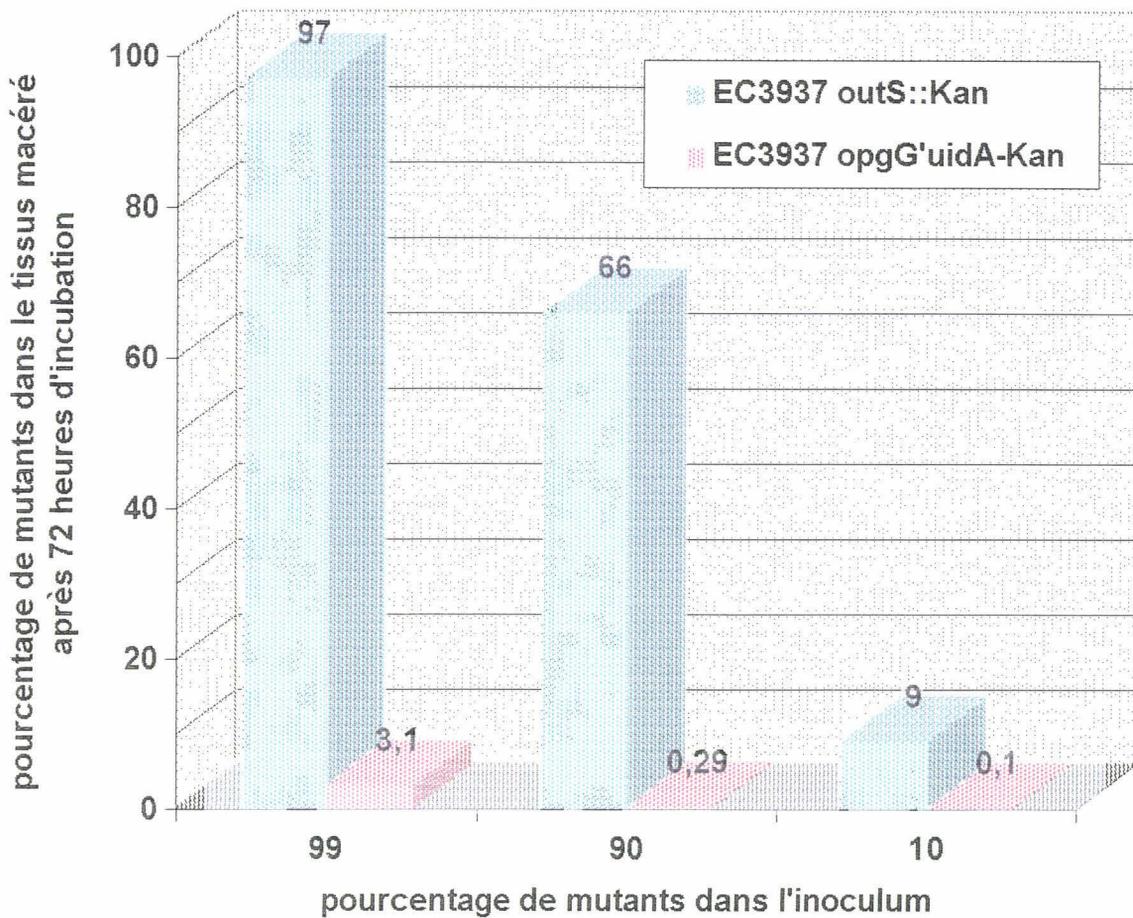


Figure 34 : Coinfection de tubercules de pomme de terre des mutants *outS* et *opgG* avec une souche sauvage. 10^7 bactéries sont inoculées dans des trous faits dans des tubercules de pomme de terre. Après 72 h d'incubation, le tissu macéré est récupéré et mis en suspension dans de l'eau physiologique (2 ml / g de tissus). Après dilution de manière à obtenir de 200 à 300 UFC sur boîte de milieu LB, les bactéries sont étalées sur boîte de milieu LB et LB + kanamycine. Le pourcentage de mutants est déterminé par le rapport nombre d'UFC sur milieu LB + kanamycine / nombre d'UFC sur milieu LB. Chaque test est réalisé sur 3 tubercules et est répété 3 fois. Les résultats correspondent à la moyenne des 9 valeurs obtenues.

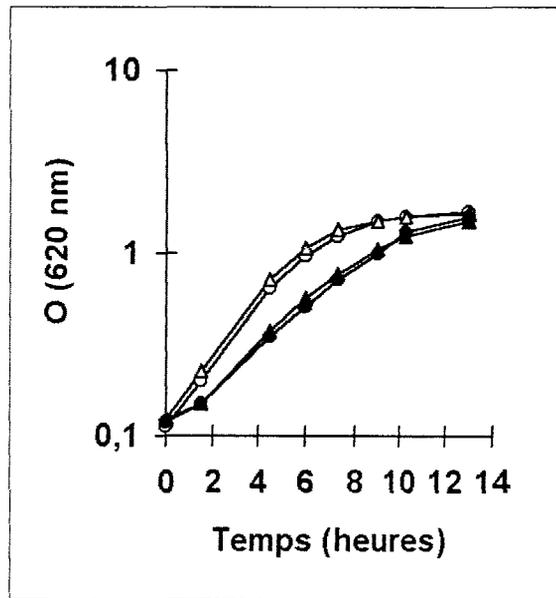


Figure 35 : Croissance des mutants *opg* en condition de carence martiale. Les souches EC3937 (sauvage, triangle) et NFB3500 (*opgG::uidA*, rond) sont cultivées en milieu 63 + glycérol carencé en fer supplémenté (symboles vides) ou non (symboles pleins) par 25 μM FeCl_3 . Les cultures sont ensemencées par des bactéries cultivées dans les mêmes conditions.

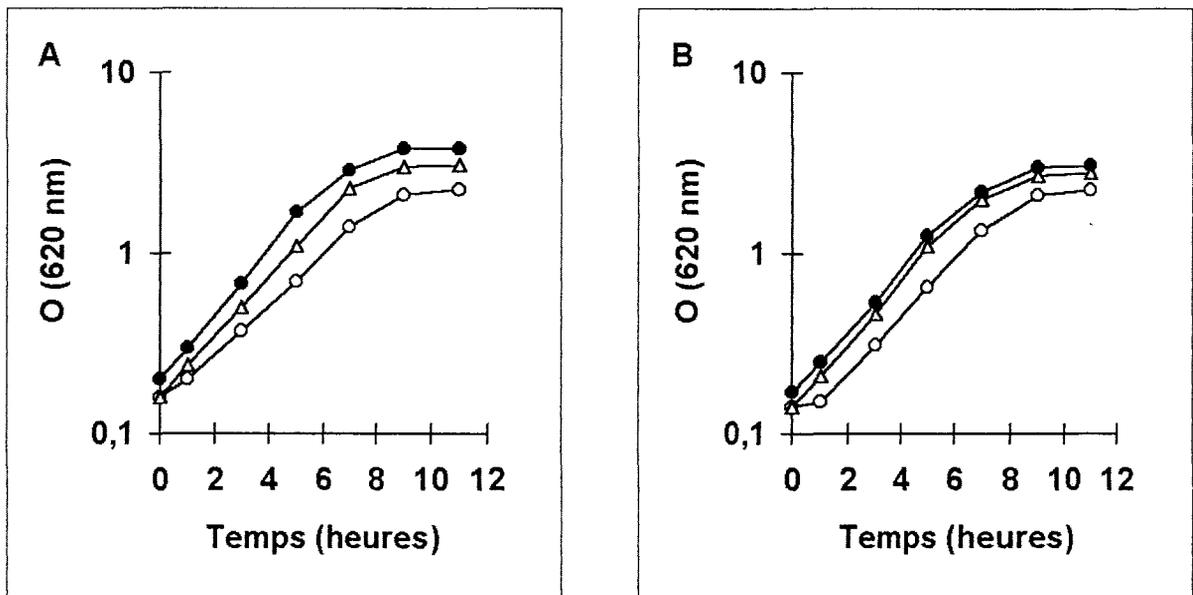


Figure 36 : Croissance des mutants *opg* en présence d'extrait de tubercules de pomme de terre. Les souches EC3937 (sauvage, **A**) et NFB3500 (*opgG::uidA*, **B**) sont cultivées en milieu 63 + glycérol (ronds blancs) en présence de 4% (vol/vol, triangles) ou de 8% (vol/vol, ronds noirs) d'extrait de tubercules de pomme de terre.

d) Croissance des mutants *opg* en présence d'extraits de tubercules de pomme de terre

Etant donné que les mutants *opg* sont hypersensibles à des composés hydrophobes tels que les sels biliaires, il est possible que des composés d'origine végétale soit responsables de l'inhibition de croissance des mutants *opg* observée *in planta*. Pour tester cette hypothèse, les souches EC3937 (sauvage) et NFB3500 (*opgG::uidA*) ont été cultivées en milieu 63 + glycérol en présence d'extrait de tubercules de pomme de terre (Figure 36 page 117). Ni la croissance de la souche sauvage ni celle de sa dérivée *Opg⁻* ne sont affectées et ce quelle que soit la quantité d'extrait de tubercules de pomme de terre utilisée.

E. RECHERCHE DE MUTANTS DE REGULATION CHEZ *E. coli*

1. ETUDE DE LA REGULATION OSMOTIQUE DE L'OPERON *mdoGH* A L'AIDE DE FUSIONS TRANSCRIPTIONNELLES

a) Construction de fusions transcriptionnelles

L'absence de régulation osmotique des fusions *opgG::uidA* et *opgH::uidA* (Tableau 7 page 107) est *a priori* en désaccord avec les résultats de Lacroix et coll. (1991) qui ont montré que, chez *E. coli*, l'abondance des ARNm de *mdoGH* est osmotiquement régulée de la même manière que la synthèse d'OPG. En effet, l'expression hétérologue de l'opéron *opgGH* chez *E. coli* permettant une synthèse d'OPG osmotiquement régulée, il est probable que les mécanismes de régulation sont conservés entre *E. chrysanthemi* et *E. coli*. Il est donc possible que la régulation osmotique de l'expression de ces opérons soit de type post-transcriptionnel. Afin de tester cette hypothèse, des fusions transcriptionnelles *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA* ont été construites.

Le plasmide pNF560, porteur d'une fusion transcriptionnelle *mdoG::uidA-Kan^R* (Figure 37 page 119) a été construit par l'insertion de la cassette *uidA-Kan^R*, obtenue à partir du plasmide pUIDK11 digéré par *PstI*, au site *PstI* de *mdoGH* porté par le plasmide pNF239 (coordonnée 0,4 kb Figure 37 page 119 ; Lacroix et coll., 1989).

Le plasmide pNF528, porteur d'une fusion transcriptionnelle *mdoH::uidA-Kan^R* (Figure 37 page 119) a été construit par l'insertion de la cassette *uidA-Kan^R*, obtenue à partir du plasmide pUIDK11 digéré par *SmaI*, entre les 2 sites *EcoRV* du plasmide pNF244 (coordonnée 2 et 2,8 kb ; Figure 37 page 119; Lacroix et coll., 1989).

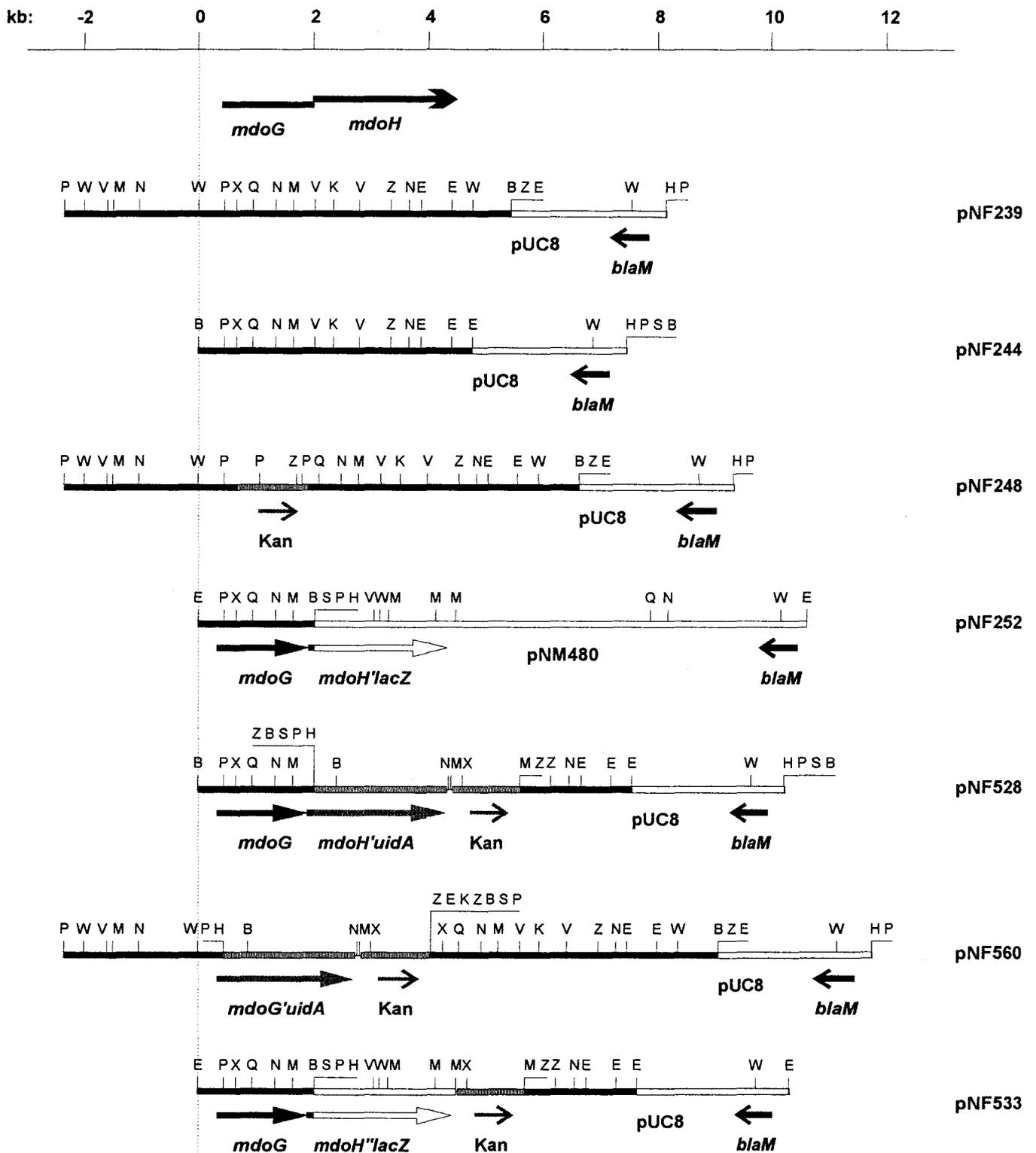


Figure 37 : Carte de restriction des principaux plasmides utilisés lors de l'étude de l'opéron *mdoGH*. A, *AgeI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *HindIII* ; K, *KpnI* ; M, *MluI* ; N, *NcoI* ; P, *PstI* ; Q, *SacII* ; S, *SalI* ; T, *SphI* ; V, *EcoRV* ; X, *XhoI* ; Z, *SmaI*.

b) Report sur le chromosome

Le plasmide pNF560, après linéarisation par une coupure *SspI* partielle, et le plasmide pNF528, après linéarisation par une coupure *HindIII* partielle, ont été introduits par transformation dans la souche JC7623 (*recB recC sbcB*). Dans ce contexte déficient en exonucléases intracellulaires, des plasmides linéaires peuvent être maintenus suffisamment longtemps pour permettre une recombinaison homologue avec le chromosome. Des clones résistants à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline ont été obtenus avec chacun des 2 plasmides. Ces clones résultent d'un événement de recombinaison homologue entre les plasmides et le chromosome et sont donc porteurs des allèles *mdoG215::uidA-Kan^R* et *mdoH213::uidA-Kan^R*.

Afin de vérifier que les insertions n'aient pas eu lieu ailleurs qu'au locus *mdoA* par un événement de recombinaison illégitime, ces 2 constructions ont été transduites dans la souche NFB720 (MC4100 *mdoH200::Tn10 pyrC46*) en sélectionnant le caractère Kan^R, la liaison entre *mdoA* et *pyrC* étant de 75% (Bohin et Kennedy, 1984a ; Lacroix et coll., 1989). La sensibilité des transductants à la tétracycline et la cotransductibilité du caractère Kan^R avec le caractère PyrC⁺ ont permis de conclure que les 2 constructions sont correctes. La souche dérivée de MC4100 portant *mdoG215::uidA-Kan^R* est appelée NFB1908, la souche dérivée de MC4100 portant *mdoH213::uidA-Kan^R* NFB1909.

Le phénotype MdoG⁻ MdoH⁺ de NFB1908 (la mutation *mdoG215::uidA-Kan^R* étant non polaire, phénomène déjà observé avec la mutation *mdoG202::neo*, Lacroix et coll., 1991) et le phénotype MdoG⁺ MdoH⁻ de NFB1909 ont ensuite été vérifiés par des tests de complémentation (Tableau 11 page 121) à l'aide de plasmides exprimant l'un, l'autre ou les 2 gènes de l'opéron *mdoGH* (Figure 37 page 119).

c) Expression des fusions *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA*

L'activité des fusions *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA* a été mesurée à basse et à haute osmolarité en phase exponentielle de croissance en milieu LOS (Tableau 12 page 121). Comme dans le cas de *opgGH*, l'activité des fusions n'est que très faiblement augmentée à basse osmolarité. La régulation osmotique ne nécessite ni la présence d'OPG ni celle des protéines MdoG et MdoH puisque des résultats similaires sont obtenus dans les contextes pNF555/NFB1908 et pNF248/NFB1909 qui produisent une quantité d'OPG similaire à celle d'une souche sauvage.

Souches	Plasmides			
	pUC8	pNF244 (MdoG ⁺ MdoH ⁺)	pNF248 (MdoG ⁻ MdoH ⁺)	pNF555 (MdoG ⁺)
NFB1908 (<i>mdoG215::uidA-Kan^R</i>)	-	++	ND	+
NFB1909 (<i>mdoH213::uidA-Kan^R</i>)	-	++	+	ND
NFB1886 (<i>mdoH215::lacZ-Kan^R</i>)	-	++	+	ND

Tableau 11 : Vérification du phénotype Opg des souches NFB1908, NFB1909 et NFB1886 par complémentation. La quantité d'OPG synthétisée est mesurée après marquage au [2-³H]glycérol et chromatographie sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 des extraits pyridine. - : absence d'OPG ; + : quantité d'OPG synthétisé similaire à celle d'une souche sauvage ; ++ : quantité d'OPG synthétisée amplifiée par rapport à une souche sauvage.

Souches	Conditions de croissance	
	LOS	LOS + 0,3 M NaCl
MC4100	27	15
NFB1908 (<i>mdoG215::uidA-Kan^R</i>)	2243	1685
pNF555/NFB1908	2133	1935
NFB1909 (<i>mdoH213::uidA-Kan^R</i>)	450	307
pNF248/NFB1909	571	364

Tableau 12 : Expression des fusions *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA* en fonction de l'osmolarité (unité arbitraire). Les dosages sont effectués sur des bactéries en phase exponentielle de croissance, les valeurs correspondent à la moyenne de 3 dosages indépendants.

Si les fusions *opgG::uidA* et *mdoG::uidA* présentent des niveaux d'expression très voisins (respectivement 2764 et 2243 unités en milieu LOS), les fusions *opgH::uidA* et *mdoH::uidA* ont par contre des niveaux d'expression très différents (respectivement 2978 et 450 unités en milieu LOS). Il est donc possible que la différence de quantité d'OPG synthétisés entre *E. coli* (30 µg d'équivalent glucose / mg de protéines pour la souche JM101 ; Talaga, 1996) et *E. chrysanthemi* (76 µg d'équivalent glucose / mg de protéines pour la souche 3937 ; Talaga, 1996) soit due pour tout ou partie à une différence d'expression de la glucosyltransférase du système.

2. CONSTRUCTION D'UNE FUSION TRADUCTIONNELLE

La régulation osmotique de la fusion *mdoH''lacZ* construite par Lacroix et coll. (1991) et l'absence de régulation des fusions *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA* étant en faveur d'un mécanisme de régulation de type post-transcriptionnel, nous avons entrepris la construction d'une fusion traductionnelle chromosomique afin de rechercher des mutants de régulation.

Afin de disposer d'une fusion traductionnelle *mdoH''lacZ* associée à un marqueur sélectionnable, le fragment *MluI-SspI* du plasmide pNF528 (coordonnées 4,4 kb et 9,7 kb Figure 37 page 119) a été cloné aux sites *MluI* et *SspI* du plasmide pNF252 (coordonnées 4,5 kb et 10,2 kb Figure 37 page 119). Le plasmide ainsi obtenu, pNF533, contient *mdoG*, la fusion *mdoH''lacZ*, le gène de résistance à la kanamycine issu de la cassette *uidA-Kan^R* puis le reste du gène *mdoH* (Figure 37 page 119). Cette construction contient donc des séquences homologues en amont et en aval suffisantes pour permettre la recombinaison sur le chromosome en utilisant la résistance à la kanamycine comme marqueur.

Après linéarisation par une digestion partielle par *SspI*, le plasmide pNF533 a été introduit par transformation dans la souche JC7623, et des clones résistants à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline ont été obtenus. Comme dans le cas des fusions transcriptionnelles, une transduction de *mdoH''lacZ-Kan^R* dans la souche NFB720 permet de vérifier la justesse de cette construction par la sensibilité des transductants à la tétracycline et la cotransductibilité des marqueurs *Kan^R* et *PyrC⁺*. Le phénotype *MdoG⁺MdoH⁺* a également été vérifié par des tests de complémentation à l'aide d'un plasmides exprimant *MdoH* (Tableau 11 page 121).

Si le plasmide pNF533 (*mdoH::lacZ-Kan^R*) confère un phénotype *Lac⁺*, la souche NFB1886 (MC4100 *mdoH215::lacZ-Kan^R*) est de phénotype *Lac⁻* que ce soit sur boîtes de milieu LB ou sur boîtes de milieu LOS et quelle que soit la concentration en NaCl (de 0 à

0,3 M). De même, aucune activité β -galactosidase n'est mesurable lors de dosages effectués sur des cultures en milieu LOS ou LB d'osmolarité variable.

Si le report de la fusion *mdoH215::lacZ-Kan^R* sur le chromosome ne permet pas d'estimer l'influence de l'osmolarité du milieu sur son expression en copie unique, le phénotype Lac⁻ de la souche NFB1886 est en revanche utilisable pour la recherche de mutants surexprimant cette fusion.

3. RECHERCHE DE MUTANTS SUREXPRIMANT LA FUSION *mdoH'lacZ*

a) Mutagenèse par la nitrosoguanidine

Afin de rechercher des clones surexprimant la fusion *mdoH215::lacZ* dans un milieu d'osmolarité moyenne (milieu LB soit 270 mosM) une mutagenèse de la souche NFB1886 a été réalisée selon le protocole décrit dans la partie matériels et méthodes. Douze collections indépendantes de mutagenèse, d'environ $5 \cdot 10^7$ bactéries par collection, ont été produites. Des cultures en phase exponentielle ont ensuite été étalées sur milieu LB + kanamycine + X-Gal (10^6 bactéries par boîte, 20 boîtes par collection), et les clones Lac⁺ ont été détectés après 24 heures d'incubation à 42 °C. Quatre des collections ont été testées, et des clones Lac⁺ ont été obtenus dans trois d'entre elles. Un clone Lac⁺ de chaque collection ont été purifiés et leurs marqueurs (Pyr⁻ Arg⁻ Kan^R) vérifiés. Le phénotype Lac⁺ a été vérifié à 30 et 42°C et persiste à 30°C pour les 3 clones. Dans l'attente de leur caractérisation, les 3 mutations ont été nommées *R1*, *R2* et *R3*.

b) Caractérisation des mutants

(1) Liaison au locus *mdoA*

Afin d'examiner la liaison au locus *mdoA* des mutations obtenues, la fusion *mdoH215::lacZ* de chacun des clones Lac⁺ a été transduite dans la souche MC4100. Les mutations *R2* et *R3* ne sont pas cotransductibles avec le caractère Kan^R (les 100 clones testés sont Lac⁻) et sont donc en *trans*, alors que la mutation *R1* est cotransductible avec le caractère Kan^R (les 7 clones obtenus sont Lac⁺) et est donc en *cis* ou fortement liée locus *mdoA*. Dans la suite de cette étude, une des mutations en *trans* (*R2*) et la mutation *R1* ont été étudiées.

(2) Synthèse d'OPG

Les souches NFB1900 (*R2*, *mdoH215::lacZ*) et NFB1901 (*R1*, *mdoH215::lacZ*) semblent surexprimer *mdoG* puisque les souches pNF248/NFB1900 et pNF248/NFB1901 produisent une quantité d'OPG, mesurée après marquage au [2-³H]glycérol et chromatographie, augmentée respectivement de 32 et de 27% par rapport à la souche pNF248/NFB1886 (Figure 38 page 125).

De même, la souche NFB1940 (*R2*, *mdoA⁺ pyrC⁺*), construite par transduction de la souche NFB1900 par un lysat de la souche A324 (*MdoA⁺ PyrC⁺*), présente une augmentation de la quantité d'OPG synthétisée de 70% à 70 mosM par rapport à une souche sauvage (Figure 39 page 125). Cette amplification est significative puisque l'expression de l'opéron *mdoGH* à partir d'un plasmide à copies multiples n'entraîne qu'une augmentation d'un facteur 3 de la synthèse d'OPG (Lacroix et coll., 1989). La mutation *R2* ne perturbe pas la régulation osmotique de la biosynthèse des OPG (Figure 39 page 125) puisque la synthèse est également augmentée à haute osmolarité par rapport à une souche sauvage (90% à 670 mosM). L'amplification observée est bien due à une augmentation de la synthèse du squelette et non à une seule stimulation de la substitution par le phosphoglycérol puisque la quantité de glucose mesurée dans chacun des pics est nettement supérieure pour la souche NFB1940 (*R2*, *mdoA⁺*) que pour la souche sauvage (Tableau 13 page 126).

(3) Activité β-galactosidase de la fusion *mdoH215::lacZ*

L'activité β-galactosidase de la fusion *mdoH215::lacZ* des souches NFB1900 et NFB1901 a été mesurée à partir de bactéries en phase exponentielle de croissance cultivées en milieu LOS et en milieu LOS + 0,3 M NaCl. Dans les deux cas, l'expression de la fusion est insensible à l'osmolarité du milieu de croissance (Tableau 14 page 126). En revanche, si l'expression de la fusion est insensible au phénotype *Opg* dans la souche NFB1900, elle est diminuée d'un facteur 3 dans un contexte *Opg⁺* dans la souche NFB1901.

(4) Impact de la mutation *R2* sur l'expression de *mdoG215::uidA*

Afin d'étudier l'impact de la mutation *R2* sur la transcription de l'opéron *mdoGH*, la fusion *mdoG215::uidA* a été transduite dans la souche NFB1940 et son expression mesurée sur des bactéries en phase exponentielle de croissance (Tableau 15 page 126). Contrairement à ce qu'on pouvait prévoir, la mutation *R2* n'entraîne pas une augmentation de l'expression de la fusion *mdoG215::uidA*, qui est même faiblement diminuée.

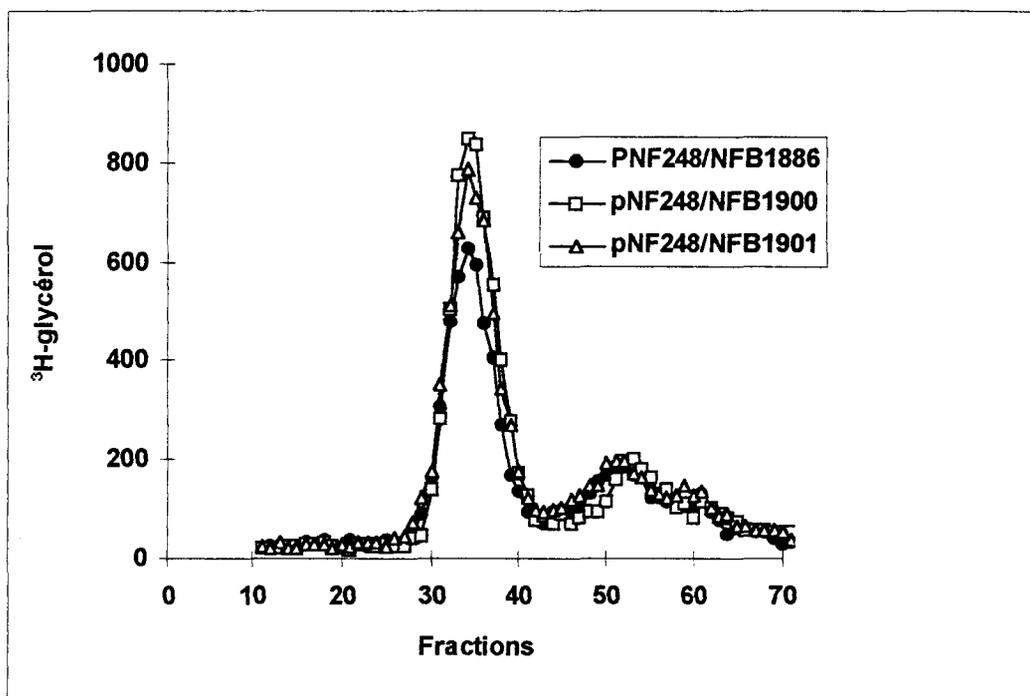


Figure 38 : Profil chromatographique sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 de 1,5 ml d'extrait pyridine des souches pNF248/NFB1886, pNF248/NFB1900 et pNF248/NFB1901, cultivées en milieu LOS [2-³H]glycérol. Les fractions ont un volume de 1,5 ml. Les résultats sont exprimés en cpm pour 0,4 ml de chaque fraction.

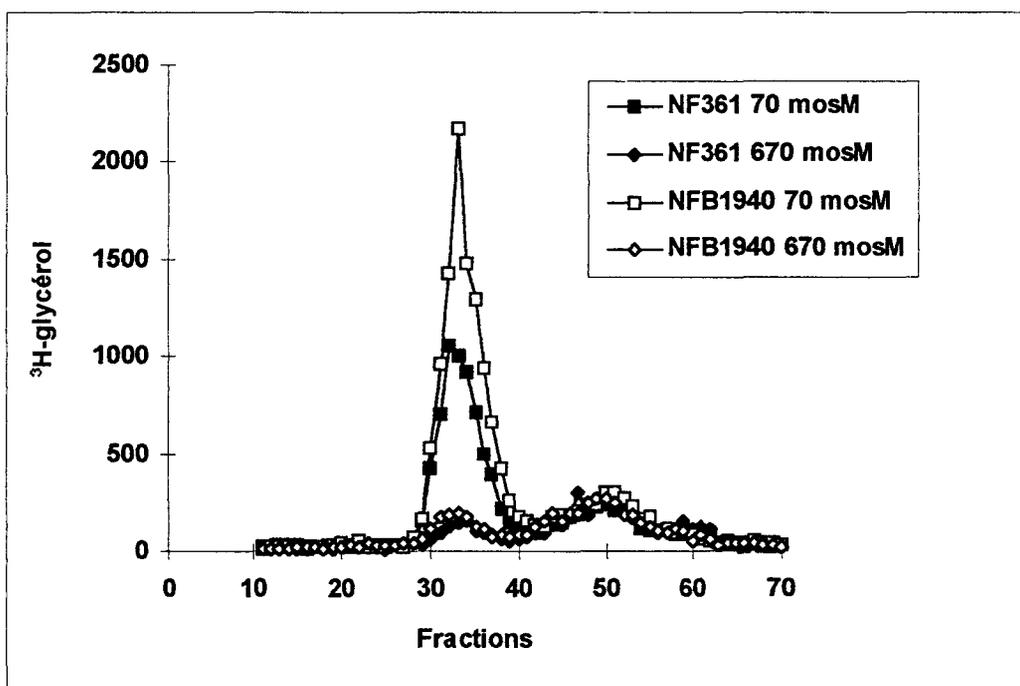


Figure 39 : Profil chromatographique sur colonne de filtration sur gel Sephadex G25 de 1,5 ml d'extrait pyridine des souches NFB361 (sauvage) et NFB1940 (*R2*), cultivées en milieu LOS [2-³H]glycérol. Les fractions ont un volume de 1,5 ml. Les résultats sont exprimés en cpm pour 0,4 ml de chaque fraction.

Souches	Conditions de croissance	
	LOS	LOS + 0,3 M NaCl
NFB361 (sauvage)	39	8
NFB1940 (R2)	60	15

Tableau 13 : Mesure de la quantité de glucose présente au sein des pics d'OPG marqués au [2-³H]glycérol (Figure 39 page 125). Les résultats sont exprimés en µg d'équivalent glucose pour 10 ml de culture.

Souches	Conditions de croissance	
	LOS	LOS + 0,3 M NaCl
pUC8/NFB1900	178	166
pNF248/NFB1900	178	158
pUC8/NFB1901	282	249
pNF248/NFB1901	108	81

Tableau 14 : Activité β-galactosidase (unité arbitraire) de la fusion *mdoH215::lacZ* des souches NFB1900 (R2) et NFB1901 (R1) dans un contexte Opg⁻ (pUC8) ou Opg⁺ (pNF248) en fonction de l'osmolarité du milieu de croissance. Le dosage est réalisé sur des bactéries en phase exponentielle de croissance cultivées en milieu de basse (LOS) ou haute (LOS+ 0,3M NaCl) osmolarité. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 dosages indépendants.

Souches	Activité β-glucuronidase
NFB1908	3096
NFB1942	2409

Tableau 15 : Activité β-glucuronidase (unité arbitraire) de la fusion *mdoG215::uidA* des souches NFB1908 (sauvage) et NFB1942 (R2). Le dosage est réalisé sur des bactéries en phase exponentielle de croissance cultivées en milieu LOS. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 dosages indépendants.

4. CARTOGRAPHIE DE LA MUTATION *R2*

a) Cartographie par conjugaison

La cartographie de la mutation *R2* a été réalisée à l'aide des souches Hfr décrites par Singer et coll. (1989), qui contiennent chacune une insertion de *Tn10* approximativement 20 minutes au delà de l'origine de transfert. Ces souches ont été utilisées comme donnatrices lors de conjugaisons avec la souche NFB1900 (*R2, mdoH215::lacZ*), la sélection étant réalisée sur milieu LB contenant de la tétracycline et de la kanamycine. Trois de ces souches permettent l'obtention de clones Lac⁻ (Figure 40A page 128) : BW6156 (dérivée *zje::Tn10* de la souche P4X, origine de transfert à 6 minutes, transfert dans le sens inverse des aiguilles d'une montre) ; BW6164 (dérivée *thr::Tn10* de la souche Ra-2, origine de transfert à 89 minutes, transfert dans le sens des aiguilles d'une montre) et BW6165 (dérivée *argE::Tn10* de la souche P801, origine de transfert à 3 minutes, transfert dans le sens contraire des aiguilles d'une montre) alors que la souche NK6051 (dérivée *purE::Tn10* de la souche HfrH, origine de transfert à 97 minutes, transfert dans le sens des aiguilles d'une montre) ne permet pas l'obtention de clones Lac⁻. Par conséquent, la mutation *R2* est localisée dans l'intervalle de 89 à 97 minutes sur la carte du génome d'*E. coli*.

b) Cartographie par transduction

Dans un premier temps, des lysats P1 des souches CAG18427 (*zje-2241::Tn10*, transposon localisé à 94,1 minutes), CAG12073 (*cycA30::Tn10*, transposon localisé à 95,5 minutes), CAG12019 (*zjg-920::Tn10*, transposon localisé à 96,2 minutes) et CAG18429 (*zjh-606::Tn10*, transposon localisé à 97,7 minutes) ont été utilisés pour transduire la souche NFB1900. Une liaison entre les phénotypes Tet^R et Lac⁻ n'est observée qu'avec *zje-2241::Tn10* (15% de cotransduction). Un pourcentage de cotransduction similaire (9%) est obtenu lorsque la souche NFB1917 (*R2, mdoH215::lacZ zje-2241::Tn10*) est utilisée comme donnatrice et la souche NFB1886 (*mdoH215::lacZ*) comme réceptrice (Tableau 17 page 131).

Nous n'avons pu confirmer la cartographie de *zje-2241::Tn10* à 94,1 minutes. En effet, si *zje-2241::Tn10* est cotransductible à 11% avec *melAB* (localisé à 93,5 minutes), il ne l'est pas avec *purA* (localisé à 94,9 minutes). Nous proposons donc une cartographie de *zje-2241::Tn10* vers 92,5 minutes, qui est d'ailleurs identique à celle obtenue par Sørensen et Hove-Jensen (1995).

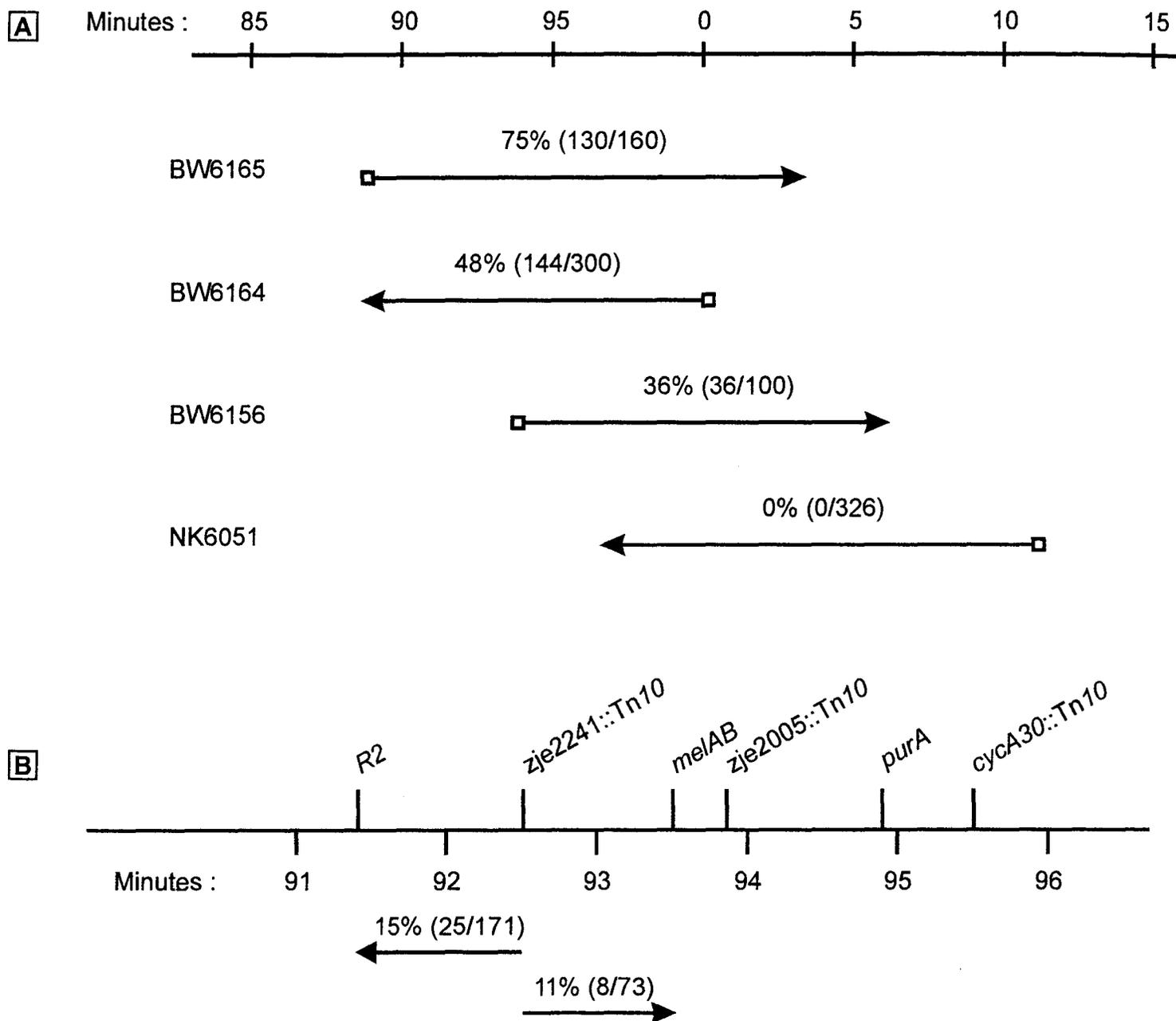


Figure 40 : Cartographie génétique de la mutation *R2*. **A** : cartographie par conjugaison à l'aide des souches Hfr décrites par Singer et coll. (1989). Les carrés représentent la localisation des *Tn10*, les flèches représentent la localisation des origines de transfert. Les pourcentages de clones de phénotype recombinant sont indiqués. **B** : cartographie par transduction de la mutation *R2*. Les pourcentages de cotransduction sont indiqués. Les flèches pointent vers le marqueur non sélectionné.

Plasmides	Phénotype	
	Mal	Lac
pTAZFGQ (<i>malF</i> ⁺ <i>malG</i> ⁺)	-	+
pNTE (<i>malE</i> ⁺)	-	+
pACYCK (<i>malK</i> ⁺)	+	+

Tableau 16 : Test de complémentation des phénotypes Mal⁻ et Lac⁺ de la souche NFB1900.

Etant donné que *R2* est cotransductible à 15% avec *zje-2241::Tn10* (localisé à 92,5 minutes) mais n'est cotransductible ni avec *zje-2005::Tn10* (localisé à 93,9 minutes) ni avec *melAB* (localisé à 93,5 minutes) *R2* est localisé vers 91,6 minutes (Figure 40B page 128).

Le locus *malB* étant localisé dans cette région, le phénotype Mal de NFB1900 a donc été testé. La souche NFB1900 est effectivement Mal⁻ et des tests de complémentation effectués avec des plasmides exprimant *malF* et *malG*, *malE* ou *malK* ont permis de montrer que le phénotype Mal⁻ est dû à une mutation récessive dans *malK* (Tableau 16 page 129). Par contre, le phénotype Lac⁺ persiste quelque soit le plasmide utilisé. Il semble donc que la mutation *malK* soit dominante en ce qui concerne la régulation de l'expression de *mdoH215::lacZ* à moins que le phénotype Lac⁺ soit indépendant du génotype *malK*.

Afin de déterminer si le caractère Lac⁺ est bien lié à *malK*, un lysat de la souche POP6476 (*malF::Tn10*) a été utilisé pour transduire la souche NFB1900 (Tableau 17 page 131). Le pourcentage de cotransduction obtenu entre les phénotypes Tet^R et Lac⁻ (74,4%) est du même ordre que celui attendu entre *malF::Tn10* et *malK* (de l'ordre de 85%). Un pourcentage similaire (70%) est obtenu lorsque la souche NFB1935 (transductant Lac⁺ *malF::Tn10* issus de la transduction du lysat de la souche POP6476 dans la souche NFB1900) est utilisée comme donnatrice et la souche NFB1886 comme réceptrice (Tableau 17 page 131).

Afin de vérifier que le caractère Mdo⁺⁺ est bien lié à *malK*, une transduction utilisant comme souche donnatrice POP6476 (*malF::Tn10*) et comme souche réceptrice NFB1940 (*R2*, *mdoA*⁺) a été réalisée et 12 des clones obtenus ont été testés (Tableau 17 page 131). Le caractère Mdo⁺ est bien cotransductible à haute fréquence avec *malF::Tn10*, le fait de n'obtenir que 50% de transductants Mdo⁺ pouvant être lié au faible nombre de clones testés ou à un biais lié à la forte proximité de *malF::Tn10* et *malK*.

Bien que le temps nous ait manqué pour mettre à profit la liaison de la mutation *R2* à *malF::Tn10*, celle-ci pourra permettre de transduire la mutation *R2* dans les souches MC4100 et DF214 (souche *pgi zwf* permettant un marquage spécifique du squelette glucosidique des OPG) afin de confirmer la relation de cause à effet entre la mutation *malK* et le phénotype Mdo⁺⁺.

Lysat transducteur	Réceptrice	Sélection (Nombre de transductants)	Phénotype	Nombre de transductants	Pourcentage de cotransduction
CAG18427 (<i>zje-2241::Tn10</i>)	NFB1900 (<i>R2, mdoH215::lacZ</i>)	Tet ^R (171)	Lac ⁺ Lac ⁻	146 25	15%
NFB1917 (<i>R2, mdoH215::lacZ</i> <i>zje2241::Tn10 mel-1</i>)	NFB1886 (<i>mdoH215::lacZ</i>)	Tet ^R (400)	Mel ⁺ Lac ⁺ Mel ⁺ Lac ⁻ Mel ⁻ Lac ⁺ Mel ⁻ Lac ⁻	37 318 0 45	Lac ⁺ : 9% Mel ⁻ : 11%
POP6476 (<i>malF::Tn10</i>)	NFB1900 (<i>R2, mdoH215::lacZ-Kan^R</i>)	Tet ^R (719)	Lac ⁻ Lac ⁺	535 184	74,4%
NFB1935 (Lac ⁺ , NFB1900 <i>malF::Tn10</i>)	NFB1886 (<i>mdoH215::lacZ</i>)	Tet ^R (454)	Lac ⁺ Lac ⁻	349 105	70%
POP6476 (<i>malF::Tn10</i>)	NFB1940 (<i>R2, mdoA⁺</i>)	Tet ^R (12)	Mdo ⁺ Mdo ⁺⁺	6 6	

Tableau 17 : Cartographie par transduction de la mutation *R2*.

IV. DISCUSSION

L'extrême diversité des caractéristiques structurales des OPG rend nécessaire leur étude chez des espèces produisant des OPG de familles différentes, afin de déterminer si ces variations ont pour origine une dérive génétique, les fonctions des OPG s'accommodant de structures très différentes dans des espèces différentes ; ou si ces variations traduisent des évolutions vers une adaptation à des propriétés physiologiques particulières (ces deux types d'hypothèses n'étant pas incompatibles). Si de nombreux travaux visant à déterminer la fonction et le mécanisme de biosynthèse des OPG ont été réalisés sur les OPG cycliques, en particulier les OPG liés en β -1,2, relativement peu de données sont disponibles en ce qui concerne les OPG linéaires branchés. De fait, l'absence de phénotype directement observable des mutants Opg^- d'*E. coli*, qui astreint à un dosage systématique des OPG, rend pratiquement impossible des méthodes d'analyse génétique telles que la mutagenèse aléatoire ou la recherche de mutations suppressives extragéniques. D'autre part, la pluralité des substituants chez *E. coli* et leur inexistence chez *P. syringae* n'ont pas permis de déterminer la fonction des substituants des OPG linéaires. Enfin, si le phénotype avirulent des mutants Opg^- constitue un crible puissant, l'importance des OPG dans la pathogénicité est beaucoup plus facile à étudier avec des bactéries phytopathogènes plutôt qu'avec des entérobactéries pathogènes d'animaux telles que *S. flexneri*.

Les OPG produits par *E. chrysanthemi*, *P. syringae* et *E. coli* appartiennent à la même famille structurale, les OPG linéaires branchés (Talaga, 1996). *E. chrysanthemi*, de par son caractère phytopathogène et l'existence d'outils génétiques, constituait *a priori* un excellent modèle d'étude des OPG de cette famille. De plus, l'étude phénotypique de mutants de substitution est facilitée chez *E. chrysanthemi*, dont les OPG ne possèdent qu'un seul type de substituant, le succinate, qui est en outre le substituant des OPG le plus répandu.

A. LES LOCUS *mdoGH* D'*E. coli* ET *opgGH* D'*E. chrysanthemi* SONT FORTEMENT CONSERVES

1. *opgGH* ET *mdoGH* SONT DES HOMOLOGUES FONCTIONNELS

Le locus *opgGH*, cloné dans un plasmide à copies multiples et exprimé sous le contrôle de son propre promoteur, permet de compléter les mutations de chacun des deux gènes de l'opéron *mdoGH* (Tableau 4 page 75). Cette complémentation intergénérique et le fait que l'inactivation de l'un ou l'autre des deux gènes de l'opéron *opgGH* abolit la synthèse d'OPG (Figure 25 page 103) nous a permis de conclure que *mdoGH* et *opgGH* sont des homologues fonctionnels.

La comparaison des séquences protéiques des produits du locus *opgGH* avec celles des produits des locus *mdoGH* d'*E. coli* et *hrpM* de *P. syringae* a révélé leur forte conservation. Les protéines OpgG, MdoG et Orf1 de *hrpM* présentent 58,7% d'acides aminés identiques et 74,3% d'acides aminés homologues. Les protéines OpgH, MdoH et HrpM présentent 61,8% d'acides aminés identiques et 76,1% d'acides aminés homologues.

Des expériences de fusion de gènes avec la β -lactamase nous ont permis de montrer que OpgG est, comme MdoG, une protéine périplasmique (Figure 16 page 88). De même, la forte similitude des profils d'hydrophobie et de la prédiction de structure secondaire des protéines OpgH et MdoH est en faveur d'une topographie de OpgH au sein de la membrane interne identique à celle établie pour MdoH (Debarbieux et coll., 1997).

Il apparaît donc que la machinerie de biosynthèse du squelette glucosidique des OPG chez *E. chrysanthemi* est en tout point semblable à celle existant chez *E. coli*.

2. L'homologue de *mdoC* N'EST PAS EN AMONT DE *opgGH*

Chez *E. coli*, le gène codant la succinyl-transférase, *mdoC*, est situé immédiatement en amont de l'opéron *mdoGH* et est transcrit de manière divergente. Compte tenu de la forte conservation de l'organisation génétique des opérons *mdoGH* et *opgGH* (Figure 23 page 101), on pouvait s'attendre à ce que *opgC*, l'homologue de *mdoC* chez *E. chrysanthemi*, soit organisé de la même manière avec *opgGH*. Cependant, l'absence de complémentation de la mutation *mdoC1::Tn5* par la région amont d'*opgGH* et l'absence de similitude de séquence de cette région avec *mdoC* ont démontré que ce n'est pas le cas. De plus, cette région ne présente de similitude avec aucune séquence du génome d'*E. coli*. Il apparaît donc que la région amont de *opgGH* ait été fortement remaniée, la séquence répétée directe présente 85 pb en amont du

site potentiel d'initiation de la transcription pouvant constituer la « cicatrice » de réarrangements chromosomiques.

Il est possible que cette différence d'organisation soit corrélée à la différence de régulation osmotique de la succinylation entre ces deux espèces. En effet, chez *E. chrysanthemi*, la substitution par le succinate augmente avec l'osmolarité, alors que chez *E. coli*, la substitution ne semble pas modifiée en fonction de l'osmolarité. Chez *E. coli*, les cadres ouverts de lecture de *mdoG* et *mdoC* ne sont séparés que de 400 pb, d'où la possibilité d'une corégulation permettant un taux de substitution constant. Dans ce cas, il est également possible que chez *E. chrysanthemi*, l'expression de *opgC* soit découplée de celle de *opgGH* d'où une substitution variable en fonction de l'osmolarité.

3. *opgGH*, *mdoGH* et *hrpM* sont fortement conservés

L'organisation génétique du locus *opgGH* est identique à celle du locus *mdoGH*, à savoir deux gènes organisés en opéron, légèrement chevauchants, suivis d'un terminateur de transcription intrinsèque (Figure 23 page 101).

De même, la séquence protéique des produits de *opgGH* est fortement conservée non seulement avec celle des produits de *mdoGH* (75,4% d'identité, 86,4% de similitude) mais aussi avec celle des produits de *hrpM* (66,7% d'identité, 80% de similitude), alors qu'*E. chrysanthemi* et *P. syringae* sont, d'un point de vue évolutif, relativement éloignées. L'hypothèse d'un transfert horizontal ayant permis l'acquisition récente de ces gènes est néanmoins à écarter puisque le GC% et l'usage des codons de chacun de ces opérons sont proches du GC% et de l'usage des codons de chaque genre bactérien (paragraphe IIIB4c page 94 ; Loubens et coll., 1993).

Le fait que les séquences nucléotidiques des opérons *opgGH*, *mdoGH* et *hrpM* présentent de fortes similitudes est donc en faveur de gènes ancêtres communs ayant été soumis à une très forte pression de sélection. Néanmoins, si les gènes de biosynthèse des OPG sont très conservés chez *E. coli*, *E. chrysanthemi* et *P. syringae*, on ne retrouve aucune similitude de séquence entre ceux-ci et les gènes de biosynthèse des OPG des Rhizobiacées.

On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle un gène ancestral commun à tous aurait évolué de manière divergente dans ces deux groupes. L'évolution du gène ancestral vers des gènes gouvernant la synthèse d'OPG cycliques aurait alors abouti aux gènes *ndv* et *chv* des Rhizobiacées, l'évolution vers des gènes gouvernant la synthèse d'OPG linéaires aux gènes homologues à *mdoGH* chez les bactéries de la subdivision gamma des protéobactéries.

Toutefois, cette hypothèse paraît peu vraisemblable, car d'une part, la divergence évolutive serait alors telle qu'aucune hybridation ADN-ADN n'est possible et d'autre part, l'organisation des gènes est totalement différente entre ces deux groupes. En effet, les gènes *ndvA* et *ndvB* de *S. meliloti* et *chvA* et *chvB* d'*A. tumefaciens* ne sont pas organisés en opéron et sont transcrits de manière convergente (Stanfield et coll., 1988 ; Douglas et coll., 1985). De plus, *X. campestris*, bien qu'appartenant à la subdivision gamma des protéobactéries, ne produit pas d'OPG linéaires mais des OPG cycliques α - β .

Une deuxième hypothèse est que des gènes différents ont évolué de manière convergente pour coder une fonction commune, indispensable à la cellule. Cette hypothèse est également improbable puisque des OPG cycliques α - β sont présents chez des bactéries classées aujourd'hui dans trois des cinq subdivisions des protéobactéries (gamma pour *X. campestris*, bêta pour *R. solanacearum* et alpha pour *R. sphaeroides* ; Talaga, 1996). Il apparaît 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.

Une troisième hypothèse est que les deux types de gènes aient coexisté chez l'ancêtre commun et qu'au cours de l'évolution, l'un ou l'autre ait été perdu. Cette hypothèse est renforcée par la découverte récente, par le groupe de S. Kaplan, de l'existence, chez *R. sphaeroides*, de gènes homologues à *mdoGH* et d'un gène homologue à *ndvB*. Il est dans ce cas possible que la synthèse des OPG tout β et des OPG complexes soient gouvernée par des gènes de type *ndv* (les gènes de type *mdoGH* ayant été perdus) ; celle des OPG linéaires branchés gouvernée par des gènes de type *mdoGH* (les gènes de type *ndv* ayant été perdu) ; celle des OPG α - β nécessitant la présence des deux systèmes. Une alternative à cette hypothèse est que l'homologue de *mdoGH* ait été acquis par *S. sphaeroides* par un transfert horizontal, quoique cette hypothèse soit improbable du fait de la divergence évolutive entre ces deux genres bactériens.

B. IMPACT DES MUTATIONS *Opg*⁻ CHEZ *E. chrysanthemi*

La forte conservation des gènes de biosynthèse des OPG chez *E. coli*, *P. syringae* et *E. chrysanthemi* semble contradictoire avec l'absence de phénotype de croissance des mutants *Opg*⁻ d'*E. coli* et d'*E. chrysanthemi* dans les conditions standards de laboratoire.

En revanche, les mutants Opg^- d'*E. chrysanthemi* sont apparus totalement incapables de croître *in planta*. De plus, contrairement à ce qui a été observé chez *E. coli*, les mutants Opg^- d'*E. chrysanthemi* présentent de nombreux phénotypes : hypersensibilité aux sels biliaires, motilité réduite, forme et division cellulaires altérées, hyperproduction d'exopolysaccharides. D'autre part, les mutants Opg^- sont affectés dans l'excrétion des exoenzymes, aussi bien celle des pectate-lyases et des cellulases, excrétées par le système Out, système de sécrétion de type II, que celle des protéases, excrétées par un système de sécrétion de type I.

L'activité pectate-lyase des mutants *pelC::lacZ* et *pelE::lacZ* est réduite d'un facteur 3 à 5 dans un contexte Opg^- (Tableau 9 page 111) Cette modeste réduction n'est donc pas suffisante pour rendre compte de l'avirulence. D'ailleurs, la co-inoculation avec une souche sauvage ne permet pas de restaurer la croissance des mutants Opg^- alors qu'elle permet la croissance d'un mutant *out*, plus fortement affecté dans l'excrétion des pectinases (Figure 34 page 116). Les mutants Opg^- ne sont pas déficients en ce qui concerne l'assimilation du fer (Figure 35 page 117), et leur croissance n'est pas affectée en présence d'extrait de tubercules de pomme de terre (Figure 36 page 117). Il n'est donc pas possible d'attribuer le défaut de croissance des mutants Opg^- *in planta* à un facteur particulier.

Chez le mutant *opgG::uidA*, l'activité β -galactosidase de la fusion *pelC::lacZ* est réduite d'un facteur 2, celle de *pelE::lacZ* d'un facteur 8, celle de *outC::lacZ* d'un facteur 2 (Tableau 10 page 113). Les mutations Opg^- pourraient donc affecter suffisamment l'export des pectate-lyases et de tout ou partie des protéines du système Out pour qu'il s'exerce une rétroaction négative sur leur expression. Il est également possible que l'absence d'OPG influence directement la régulation de l'expression de ces gènes.

L'impact des mutations Opg^- sur la production des pectate-lyases dépend des conditions de croissance des bactéries. Ainsi, alors que sur milieu gélosé, aucun halo de dégradation du PGA n'est observé en présence de glycérol (Figure 29 page 110), un halo est observé en absence de glycérol (Figure 30 page 110) et l'activité pectate-lyase en milieu liquide en présence de glycérol n'est réduite que d'un facteur trois à cinq par rapport à une souche sauvage (Tableau 9 page 111).

Le dosage de l'activité β -galactosidase des fusions *pelE::lacZ* et *pelC::lacZ* a permis de corrélérer ces différences de production de pectate-lyases à une variation de transcription des gènes *pel*, en particulier celle de *pelC* (Tableau 10 page 113). En effet l'expression de la fusion *pelC::lacZ* est augmentée d'un facteur 8 en milieu liquide (alors qu'elle ne varie pas dans un contexte Opg^+) et d'un facteur 54 en milieu gélosé sans glycérol (alors qu'elle n'est

augmentée que d'un facteur 3 dans un contexte Opg^+) par rapport à la valeur obtenue en milieu gélosé contenant du glycérol. La fusion *pelE::lacZ* n'est quant à elle augmentée qu'en milieu gélosé sans glycérol (d'un facteur 3,6 par rapport à un milieu gélosé en présence de glycérol), alors qu'aucune augmentation n'est observée dans un contexte Opg^+ .

Il apparaît donc que les mutations Opg^- affectent la régulation de l'expression des gènes *pel*. Etant donné que ces mutations affectent également l'expression de la fusion *outC::lacZ*, on peut émettre l'hypothèse que l'absence d'OPG perturbe le réseau de régulation pour partie commun aux gènes *pel* et *out*. Ainsi, il est possible que l'absence d'OPG perturbe le fonctionnement du couple capteur-régulateur PecS/PecM qui régule négativement l'expression de ces gènes (Reverchon et coll., 1994). En effet, chez *E. coli*, les OPG sont indispensables au fonctionnement du couple EnvZ/OmpR dans des milieux de très basse osmolarité (Geiger et coll., 1992) et leur absence pourrait perturber le fonctionnement du couple RcsC/RcsB régulant l'expression des gènes *cps* (Ebel et coll., 1997).

Les mutations Opg^- affectent également l'expression des gènes gouvernant la synthèse des exopolysaccharides, puisque l'expression d'une fusion *epsG::lacZ* est augmentée d'un facteur 3 dans un contexte Opg^- (Tableau 8 page 108). Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce phénomène : soit l'absence d'OPG perturbe également le fonctionnement du système de régulation des gènes *eps*, soit l'augmentation de la quantité d'UDP-glucose disponible entraîne une augmentation de l'expression des gènes *eps*, impliqués dans son utilisation.

Le caractère pléiotrope du phénotype des mutants Opg^- est en faveur d'une altération de l'intégrité de l'enveloppe. En effet, ces mutations affectent de nombreux composants de l'enveloppe : le flagelle, les systèmes de sécrétion de type I et II, éventuellement certains couples capteur-régulateur et enfin, dans certaines conditions, les systèmes impliqués dans la septation. L'absence d'OPG perturbe donc soit le fonctionnement soit la biogénèse de ces différents systèmes.

Wandersman et Létoffé (1993) ont montré que des mutations dans les gènes *rfaH* et *galU* réduisent la sécrétion de l'hémolysine et des protéases d'*E. chrysanthemi* exprimées chez *E. coli* en réduisant l'incorporation de TolC et de PtrF dans la membrane externe. Ces deux gènes étant impliqués dans la biosynthèse du LPS, qui aurait un rôle de chaperon vis-à-vis de certaines protéines de la membrane externe, les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle le défaut de synthèse du LPS serait responsable de la diminution de l'incorporation de TolC et de PtrF dans la membrane externe. Comme un mutant *galU* ne synthétise pas d'OPG et que les mutants Opg^- d'*E. chrysanthemi* n'excrètent plus de protéases, il est

possible que ce soit en fait l'absence d'OPG qui perturbe l'incorporation de PtrF dans la membrane externe chez le mutant *galU*.

De même, Swart et coll. (1993) ont montré que les mutants *chvB* d'*A. tumefaciens* ne produisent plus une rhicadhésine active. Il est donc possible que chez *E. chrysanthemi* la réduction des activités pectate-lyase et cellulase soit due à une perturbation de la mise en conformation de ces protéines.

Il est frappant de constater que l'absence d'OPG conduit, vis-à-vis des interactions bactérie-plante, à des phénotypes similaires aussi bien chez les Rhizobiacées, chez *P. syringae* et chez *E. chrysanthemi*, alors que ces espèces produisent des OPG de structures différentes et que les facteurs d'interaction bactérie-plante sont différents. Cette observation est en faveur d'une fonction des OPG commune, indispensable dans les milieux naturels, pouvant s'accomoder de structures différentes, vraisemblablement impliquée dans l'intégrité de l'enveloppe.

Le phénotype des mutants Opg^- d'*E. chrysanthemi* est indépendant de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries. Néanmoins, la croissance de ces mutants est affectée en milieu de très basse osmolarité. De même, chez *E. coli*, l'absence d'OPG ne perturbe le fonctionnement de EnvZ que dans des milieux de très basse osmolarité (Geiger et coll., 1992) et chez *S. meliloti*, la plupart des phénotypes associés aux mutations Opg^- sont partiellement supprimés par une élévation de l'osmolarité (Dylan et coll., 1990a). Il est donc vraisemblable que les OPG jouent également un rôle dans l'adaptation à des milieux de très basse osmolarité.

C. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES OPG CHEZ *E. coli*

Chez *E. coli*, trois niveaux de régulation de la biosynthèse des OPG ont été mis en évidence : une régulation osmotique, une régulation en fonction de la phase de croissance et un rétrocontrôle, par les OPG eux-mêmes ou un intermédiaire de synthèse.

L'addition de chloramphénicol ou de rifampicine lors d'un transfert de haute à basse osmolarité supprime l'augmentation du taux de synthèse, la synthèse d'ARN messager et de protéine est donc nécessaire à l'augmentation du taux de synthèse à basse osmolarité (Lacroix, 1989). De plus, la quantité d'ARN messager de l'opéron *mdoGH* cloné dans un plasmide à copies multiples est 5 fois plus importantes à basse osmolarité et l'expression d'une protéine de fusion MdoH''LacZ est 7 fois plus importante à basse osmolarité, aussi bien dans un contexte Opg^+ que dans un contexte Opg^- (Lacroix et coll., 1991). L'ensemble

de ces résultats est donc fortement en faveur d'une régulation osmotique de l'expression de *mdoGH*. Cependant, des mutations de *envZ*, *rpoS*, *himA*, *himD* ou *hns*, gènes souvent impliqués dans les régulations génétiques en fonction de l'osmolarité, ne perturbe pas la régulation osmotique de la biosynthèse des OPG (Lacroix, communication personnelle).

L'existence d'une régulation au niveau génétique n'exclue pas la possibilité d'une régulation de l'activité enzymatique de synthèse. En particulier, la chute brutale de la synthèse d'OPG lors d'une transition d'un milieu de basse osmolarité à un milieu de haute osmolarité (Bohin et Kennedy, 1984b ; Lacroix et Bohin, résultats non publiés) nécessite une régulation directe de l'activité enzymatique de synthèse. Cette situation serait similaire à celle existant dans le cas du système de transport de la glycine-bétaïne, ProU, qui est osmotiquement régulé à la fois au niveau de l'activité du système de transport et au niveau génétique (Cairney et coll., 1985).

Les mécanismes de régulation semblent conservés chez *E. coli* et *E. chrysanthemi*, puisque l'expression en multicopies de *opgGH* chez *E. coli*, exprimé à partir de son propre promoteur, permet une synthèse d'OPG amplifiée et osmorégulée de la même manière que lorsque *mdoGH* est exprimé en multicopies (Tableau 4 page 75).

Néanmoins, contrairement à ce qu'on pouvait prévoir, l'expression des fusions transcriptionnelles *opgG::uidA* et *opgH::uidA* n'est pas régulée par l'osmolarité (Tableau 7 page 107), ce qui semblait contradictoire avec les résultats obtenus chez *E. coli*. Pourtant, la construction des fusions équivalentes chez *E. coli* nous a permis de montrer que l'expression des fusions *mdoG::uidA* et *mdoH::uidA* ne sont pas non plus régulées par l'osmolarité (Tableau 12 page 121). D'autre part, si les fusions *opgG::uidA* et *opgH::uidA* ont des niveaux d'expression similaires, une différence importante de l'expression des fusions *opgH::uidA* et *mdoH::uidA* a été constatée. Cette différence pourrait être corrélée à la plus grande quantité d'OPG synthétisée par *E. chrysanthemi*, qui serait alors due à une expression plus importante de la glucosyltransférase du système.

L'absence de régulation osmotique des fusions transcriptionnelles peut-être interprétée de deux manières : soit l'expression des opérons *mdoGH* et *opgGH* n'est pas régulée par l'osmolarité, soit le mécanisme de régulation est post-transcriptionnel. La première hypothèse est pourtant improbable, car même si l'étude de la régulation osmotique de l'expression de *mdoGH* au niveau génétique reste soumise à controverse du fait de l'utilisation de plasmides à copies multiples (Kennedy, 1996), il n'en reste pas moins que l'augmentation du taux de synthèse des OPG à basse osmolarité nécessite une néosynthèse d'ARNm et de protéines.

Il est donc possible que la régulation osmotique implique une différence de stabilité des ARNm (compatible avec la variation de la quantité d'ARNm de l'opéron *mdoGH* en fonction de l'osmolarité), ou une différence de traductibilité en fonction de l'osmolarité. Dans les deux cas, il est alors probable que les régions impliquées dans la régulation soient situées à l'intérieur des phases codantes.

Récemment, un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de la biosynthèse du glycogène par la protéine CsrA (carbon storage regulator) a été mis en évidence (Liu et coll., 1995). CsrA est un régulateur général impliqué dans la régulation du métabolisme du carbone et des propriétés de la surface cellulaire (Romeo, 1998). CsrA réprime l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du glycogène, de la phosphoglucomutase, de la glycogène-phosphorylase, réprime la néoglucogenèse via la répression de l'expression de la fructose-1,6-biphosphate-phosphatase de la PEP-synthetase et de la PEP-carboxykinase, et active la glycolyse *via* une stimulation de l'expression de la phosphoglucose-isomérase, de la triose-phosphate-isomérase et de l'énolase. CsrA réprime l'expression des gènes qu'elle contrôle *via* une déstabilisation des ARNm, consécutive à sa fixation au niveau de l'ARNm. L'activation, quant à elle, pourrait résulter d'une stabilisation de l'ARNm ou d'une régulation négative d'un represseur. L'activité de CsrA est contrôlée par un ARN non codant, CsrB, grâce à un équilibre entre la forme libre de CsrA (ou de la forme CsrA-ARNm) et le complexe ribonucléoprotéique CsrA-CsrB. Comment l'activité de CsrA/CsrB est contrôlée par les paramètres environnementaux et la physiologie cellulaire est à l'heure actuelle inconnu. Ce type de régulation serait conservé chez les Eubactéries (Romeo, 1998). Par exemple, des homologues de CsrA et CsrB, RsmA et AepH existent chez *E. carotovora* et sont impliqués dans la modulation de la pathogénicité car participent au contrôle de la production des exoenzymes et de la protéine HrpN. RsmA et AepH sont également impliqués dans la biogenèse du flagelle, la production d'exopolysaccharides et de caroténoïdes (Hugouvieux-cotte-Pattat et coll., 1996 ; Romeo, 1998).

Une régulation transcriptionnelle n'est toutefois pas à écartée puisque le score de similitude au consensus du promoteur de *mdoGH* (57%) est du même ordre que celui du promoteur fort *placUV5* (59,2%) alors que l'activité du promoteur de *mdoGH* serait 150 à 200 fois moins élevée que l'activité du promoteur *lacZ* induit (Loubens, 1993). Le fait que le promoteur de *mdoGH* soit fortement semblable au consensus, mais que les gènes *mdoG* et *mdoH* soient très faiblement exprimés (les ARNm synthétisés par une souche *Opg*⁺ dépourvue de plasmide *mdoGH*⁺ n'ayant jamais pu être visualisés par Northern blot), alors que l'usage des codons de *mdoGH* ne suit pas l'usage des codons des protéines faiblement représentées

(Loubens et coll., 1993), suggère l'existence d'un mécanisme de répression de l'expression de ce locus. De plus, la comparaison des régions 5' des opérons *mdoGH* et *opgGH* a révélé une très forte similitude des régions promotrices (81% d'identité des 31 pb incluant les séquences -10 et -35, 61% d'identité des 115 pb comprises entre la séquence répétée directe et le codon d'initiation de *opgGH*). Cette conservation est en faveur d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle commun à ces deux espèces, par exemple une compétition entre l'ARN-polymérase et un repressur.

L'utilisation de la fusion traductionnelle chromosomique *mdoH215::lacZ* s'est révélée être un outil efficace pour la recherche de mutants de régulation. En effet, le phénotype Lac⁻ conféré par cette fusion a permis d'obtenir deux mutations surexprimant grâce au phénotype Lac⁺ qu'elles confèrent.

La mutation *R1* est localisée en *cis* ou touche un gène régulateur fortement lié à *mdoGH*. L'activité β-galactosidase de la fusion *mdoH215::lacZ* est, dans ce contexte, insensible à l'osmolarité du milieu de croissance, mais est diminuée d'un facteur 3 en présence de la protéine MdoH (Tableau 14 page 126). Pourtant, l'expression de MdoH en *trans* n'affecte pas l'expression de la fusion transcriptionnelle *mdoH213::uidA* de la souche NFB1909 (Tableau 12 page 121). Il est donc possible que MdoH régule sa propre expression au niveau traductionnel. Ce type d'autorégulation existe d'ailleurs dans le cas de PutA, proline-déshydrogénase associée à la membrane cytoplasmique régulant sa propre expression au niveau transcriptionnel (Maloy et Stewart, 1993).

Lacroix et coll. (1991) ont montré que l'expression de la fusion *mdoH''lacZ* portée par le plasmide pNF252 n'est pas affectée par la mutation *mdoH200::Tn10*. Néanmoins, dans ce cas, il est possible que la présence de la fusion en copies multiples permettent une synthèse d'ARNm suffisante pour titrer la protéine MdoH, dont l'absence serait alors sans conséquence sur l'expression de la fusion. Il est donc envisageable que la mutation *R1* augmente suffisamment l'expression de la fusion pour que celle-ci puisse être mesurée, mais pas assez pour que la quantité d'ARNm synthétisée titre MdoH.

La mutation *R2* entraîne une surexpression de la fusion *mdoH215::lacZ* du même ordre que la mutation *R1*, mais l'expression est insensible à la présence de MdoH (Tableau 14 page 126). De plus, cette mutation n'entraîne pas une augmentation de l'expression de la fusion *mdoH213::uidA*, qui est même faiblement diminuée (Tableau 15 page 126). Enfin, cette mutation ne perturbe pas la régulation osmotique de la biosynthèse des OPG (Figure 39 page 125) alors que l'expression de la fusion *mdoH215::lacZ* est dans ce contexte insensible à l'osmolarité du milieu (Tableau 14 page 126).

Le fait que dans un contexte *R2*, la synthèse d'OPG soit osmorégulée mais que l'expression de la fusion *mdoH215::lacZ* soit indépendante de l'osmolarité suggère que la régulation génétique en fonction de l'osmolarité ne concerne pas l'expression de MdoH. Dans ce cas, la néosynthèse d'ARNm et de protéines nécessaire à l'augmentation du taux de synthèse d'OPG lors d'un transfert dans un milieu de basse osmolarité ne concernerait pas l'opéron *mdoGH* mais un autre gène impliqué dans la biosynthèse, par exemple celui codant l'accepteur membranaire. Néanmoins, il est désormais légitime de s'interroger sur la validité de l'utilisation de cette fusion pour l'étude de la régulation osmotique de l'opéron *mdoGH*. En effet, si le mécanisme de régulation fait intervenir une variation de la stabilité des ARNm de *mdoGH* ou une variation de la traductibilité en fonction de l'osmolarité, il est possible que l'atteinte à l'intégrité des ARNm que constitue cette fusion abolisse la régulation. Ce type de régulation existe par exemple dans le cas de RpoS, dont l'expression est osmotiquement régulée au niveau post-transcriptionnel, à la fois par l'augmentation de la traductibilité et par une inhibition du renouvellement de RpoS à haute osmolarité (Muffler et coll., 1996). Dans ce cas, il faut alors admettre que les résultats obtenus par l'utilisation du plasmide pNF252 ne reflètent pas la régulation *in vivo* de *mdoGH*.

La mutation *R2* ne perturbe pas la régulation osmotique de la biosynthèse des OPG, mais provoque une amplification de la synthèse d'OPG (Figure 39 page 125). Comme cette mutation entraîne une surexpression de la fusion *mdoH215::lacZ*, il est probable que l'amplification de la synthèse d'OPG est due à une surproduction de MdoH, et éventuellement de MdoG. Etant donné que la mutation *R2* n'augmente pas l'expression de la fusion *mdoH213::uidA*, il apparaît que le mécanisme affecté est, là encore, de type post-transcriptionnel.

La mutation *R2* est, selon toute vraisemblance, localisée dans *malK*. En effet, la cartographie de la mutation *R2* (91,6 minutes, Figure 40 page 128) est compatible avec la localisation de *malK* (91,5 minutes), la mutation *R2* est cotransductible à haute fréquence avec *malF::Tn10* (Tableau 17 page 131) et le mutant *R2* a un phénotype Mal⁻ pouvant être complémenté à l'aide d'un plasmide exprimant *malK*. La vérification de la relation de cause à effet entre la mutation *malK* et le phénotype Mdo⁺⁺ est actuellement en cours au laboratoire.

MalK est la sous-unité ATPasique du transporteur de type ABC impliqué dans le transport du maltose constitué par le complexe MalFGK₂ (Boos et Schuman, 1998). MalK, sous forme de dimère, interagit avec MalF et MalG lorsque le complexe maltose-MalE (protéine affine périplasmique) est présent, et fournit l'énergie nécessaire à la translocation du maltose. MalK est également impliquée dans la répression du régulon maltose *via* une

interaction, en absence d'inducteur, avec MalT, activateur transcriptionnel du régulon maltose. MalK est également la cible de la forme non phosphorylée de l'enzyme EIIA^{Glc} du PTS (système phosphotransférase) lors de l'exclusion de l'inducteur.

Divers indices suggèrent que MalK pourrait interagir avec une protéine régulatrice de l'expression de *mdoGH* : MalK interagit avec différentes protéines, MalF, MalG, MalT, et EIIA^{Glc} ; la mutation *R2* provoque une augmentation de l'expression de la fusion *mdoH215::lacZ* ; MalK est directement impliquée dans la répression du régulon maltose ; l'expression de *malK* est osmotiquement régulée et est réprimée à haute osmolarité (Bukau et coll., 1986).

De plus, dans un contexte *R2*, l'expression de la fusion *mdoH215::lacZ* est insensible à la présence de MdoH, contrairement à ce qui est observé dans un contexte *R1* (Tableau 14 page 126). Il est donc possible que MalK interagisse avec MdoH pour contrôler l'expression de *mdoGH* et que cette interaction soit indispensable au rétrocontrôle exercé par MdoH.

Le phénotype Lac⁺ du mutant *R2* persiste lorsque *malK* est exprimée à partir d'un plasmide à copies multiples. Si le caractère dominant de la mutation *malK* est compatible avec une mutation « gain de fonction », il est étonnant que cette mutation s'accompagne d'une perte de fonction dans le transport, alors que les mutations qui affectent le transport sont séparées des mutations qui affectent la régulation (Boos et Schuman, 1998). La mutation *malK* pourrait donc renforcer l'interaction de MalK avec l'effecteur impliqué dans la régulation de l'expression de *mdoGH* tout en abolissant l'interaction de MalK avec MalF et MalG.

Cette possible interconnection du régulon maltose et de la biosynthèse des OPG souligne l'importance du carefour métabolique glucose-1-phosphate-glucose-6-phosphate. Le glucose-6-phosphate est à la base de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates et est précurseur de la synthèse du tréhalose. Le glucose-1-phosphate est d'une part le précurseur de l'UDP-glucose, lui-même précurseur de synthèse des OPG, du LPS, du tréhalose et de l'acide colanique, et d'autre part de l'ADP-glucose, précurseur de la synthèse du glycogène.

Il est donc vraisemblable que les voies d'utilisation du glucose-1-phosphate (donc de l'UDP-glucose et de l'ADP-glucose) et du glucose-6-phosphate soient interdépendantes. Par exemple, une telle interconnection a déjà été démontrée entre les métabolismes du maltose et celui du tréhalose (Klein et Boos, 1993 ; Boos et Schuman, 1998), soluté compatible accumulé en cas de stress hyperosmotique. D'une part, le tréhalose induit le régulon maltose, puisque les produits de dégradation du tréhalose par la tréhalase TreC, glucose et glucose-6-phosphate (et donc glucose-1-phosphate *via* l'action de la phosphoglucomutase) sont

précurseurs de la synthèse de l'inducteur interne, le maltotriose. D'autre part, TreC serait également impliquée dans la synthèse de l'inducteur interne. Enfin, la maltoporine LamB est impliquée dans le transport du tréhalose.

Ce type d'interconnection permet une régulation fine du métabolisme en fonction des conditions environnementales, essentiellement la disponibilité en sources de carbone mais aussi les paramètres physico-chimiques comme l'osmolarité. Ainsi, la synthèse du tréhalose et celle de l'acide colanique sont augmentées à haute osmolarité, alors que la synthèse d'OPG est réprimée dans ces conditions.

D. PERSPECTIVES

E. chrysanthemi constitue, comme nous l'avions escompté, un excellent modèle d'étude de la biosynthèse des OPG linéaires branchés et le phénotype fortement marqué des mutants *Opg*⁻ chez cette espèce devrait faciliter l'étude des relations structure-fonctions des OPG à travers les gènes responsables de la substitution et de la structure du squelette.

La recherche du gène *opgC* d'*E. chrysanthemi* est actuellement en cours au laboratoire, par criblage d'une collection de mutants, obtenue par insertion d'éléments transposables, par une méthode d'extraction rapide des OPG sur des micro-cultures et analyse par chromatographie sur couche mince, stratégie déjà utilisée avec succès chez *E. coli* et *R. sphaeroides*. De même, l'insertion du gène *mdoB* par recombinaison ectopique sur le chromosome d'*E. chrysanthemi* pourrait permettre d'obtenir des OPG substitués par des résidus de phosphoglycérol. Ces différents allèles permettraient d'obtenir des souches produisant des OPG non substitués, substitués par des résidus de succinate, substitués par des résidus de phosphoglycérol, ou encore par les deux à la fois. Ces souches constitueraient un outil efficace pour comprendre l'importance de la substitution des OPG par l'étude de leur virulence et des autres phénotypes associés aux mutations *Opg*⁻.

La découverte chez *E. coli* d'un nouveau gène, *mdoD*, influençant la structure des OPG en phase stationnaire ouvre la possibilité de modifier la structure du squelette glucosidique des OPG produits. Des sondes comprises dans les régions conservées de *mdoG*, *opgG* et *mdoD* seront utilisées pour rechercher par PCR le gène *opgD* chez *E. chrysanthemi* et en construire des mutants. L'impact des mutations *opgD* sur la structure des OPG et sur la pathogénicité pourra ainsi être étudié.

La similitude des phénotypes conférés par les mutations *Opg*⁻ chez *E. chrysanthemi* et les Rhizobacées suggère une fonction commune. Il est donc envisageable d'exprimer *opgGH*

chez un mutant *ndvB* de *S. meliloti* et, après avoir vérifié que des OPG linéaires sont synthétisés, vérifier si les propriétés de chimiotactisme sont restaurées, et au delà si les bactéries sont de nouveau capables de coloniser efficacement des nodules de plantes légumineuses.

Chez *E. coli*, différents indices suggèrent que les enzymes impliquées dans la synthèse du squelette et sa substitution interagissent dans et à la surface de la membrane cellulaire. L'absence de phénotype marqué lié aux mutations *Opg⁻* représentait clairement un handicap pour l'étude de la machinerie de biosynthèse. Chez *E. chrysanthemi*, une recherche de mutations suppressives extragéniques de mutations ponctuelles de *opgG* et *opgH* devrait permettre de révéler les interactions supposées.

Il devient également possible de rechercher des mutations suppressives extragéniques permettant de restaurer, au moins de façon partielle, la capacité de croissance *in planta* des mutants *Opg⁻* d'*E. chrysanthemi*. Les autres phénotypes liés aux mutations *Opg⁻*, en particulier l'hypersensibilité aux sels biliaires et la réduction de la motilité, pourraient également être exploités. L'analyse de ces mutations devrait permettre d'appréhender la nature du défaut que confère l'absence d'OPG et les interactions des OPG avec d'autres constituants de l'enveloppe.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, 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.
- Akatsuka, H., R. Binet, E. Kawai, C. Wandersman, and K. Omori.** 1997. Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *J. Bacteriol.* **179**: 5754-5760.
- Aldeberg, E. A., M. Mandel, and G. Chein Ching Chen.** 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N¹-methyl-N¹-nitroso-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**: 788-795.
- Alfano, J. R., J. H. Ham, and A. Collmer.** 1995. Use of Tn δ tacl to clone a *pel* gene encoding a highly alkaline, asparagine-rich pectate lyase isozyme from an *Erwinia chrysanthemi* EC16 mutant with deletions affecting the major pectate lyase isozymes. *J. Bacteriol.* **177**: 4553-4556.
- Altabe, S., N. Inon 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.
- Altabe, S. G., N. Inon de Iannino, D. de Mendoza, and R. A. Ugalde.** 1994. New osmoregulated β (1-3), β (1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **436**: 4890-4898.
- Altabe, S., P. Talaga, J. -M. Wieruszkeski, G. Lippens, R. Ugalde, and J. -P. Bohin.** 1998. Osmoregulated periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*. In Elmerich C. et al. (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, p. 390.
- 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-Mr polysaccharides containing (1,2)- β -D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2443-2452.
- Andersson, H. and G. von Heijne.** 1993. Sec dependant and Sec independant assembly of *E. coli* inner membrane proteins: the topological rules depend on chain length. *EMBO J.* **12**: 683-691.
- Andro, T., J. P. Chambost, A. J. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. Van Gijsegem, and A. Coleno.** 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacteriol.* **160**: 1199-1203.
- Asai, Y., Y. Katayose, C. Hikita, A. Ohta, and I. Shibuya.** 1989. Suppression of the lethal effect of acidic-phospholipid deficiency by defective formation of the major outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 6867-6869.
- Ayers, A. R., B. Valent, J. Ebel, and P. Albersheim.** 1976. Host-pathogen interactions XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiol.* **57**: 766-774.
- Aymeric, J.-L., A. Guiseppi, M. C. Pascal, and M. Chippaux.** 1988. Mapping and regulation of the *cel* genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 95-101.
- Bardonnat, N., and C. Blanco.** 1992. *uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 243-248.
- Barras, F., J.-P. Chambost, and M. Chippaux.** 1984. Cellobiose metabolism in *Erwinia*: genetic study. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 486-490.
- Barras, F., K. K. Thurn, and A. K. Chatterjee.** 1986. Export of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) protease by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**: 343-348.
- Barras, F., K. K. Thurn, and A. K. Chatterjee.** 1987. Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 319-325.

- Barras, F., F. Van Gijsegem, and A. K. Chatterjee.** 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 201-234.
- 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.
- Bauer, D. W., A. J. Bogdanove, S. V. Beer, and A. Collmer.** 1994. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 573-581.
- Bauer, D. W., Z. M. Wei, S. V. Beer, and A. Collmer.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* harpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 484-491.
- Beaulieu, C., M. Boccara, and F. Van Gijsegem.** 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 197-202.
- Benincasa, M., G. P. Cartoni, F. Coccioli, R. Rizzo, and L. P. T. M. Zevenhuizen, L.P.T.M.** 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.
- Benz, R., E. Maier, and I. Gentshev.** 1993. TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* **278**: 187-196.
- Bertoni, G., and D. Mills.** 1987. A simple method to monitor growth of bacterial populations in leaf tissue. *Phytopathology.* **77**: 832-835.
- 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.
- Bhagwat, A. A., R. E. Tully, and D. L. Keister.** 1993. Identification and cloning of cyclic β -(1,3), β -(1,6)-D-glucan synthesis locus from *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **114**: 139-144.
- 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., K.C. Groos, R. E. Tully, and D. L. Keister.** 1996. β -glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1,6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**: 4635-4642.
- Bhagwat, A. A., and D. L. Keister.** 1992. Synthesis of β -glucans by *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium fredii*. *Can. J. Microbiol.* **38**: 510-514.
- Binet, R., and C. Wandersman.** 1995. Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* **14**: 2298-2306.
- Blattner, F. R., G. 3rd Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1474.
- Bliss, J. M., and R. P. Silver.** 1996. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol. Microbiol.* **21**: 221-231.
- Boccara, M., A. Diolez, M. Rouve, and A. Kotoujansky.** 1988. The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on *Saintpaulia* plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**: 95-104.
- Boccara, M., R. Vedel, D. Lalo, M. H. Lebrun, and J. F. Lafay.** 1991. Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**: 293-299.
- Boccara, M., J.-L. Aymeric, and C. Camus.** 1994. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bacteriol.* **176**: 1524-1526.
- 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.
- Boos, W., and H. Shuman.** 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**: 204-229.
- Bortoli-German, I., E. Brun, B. Py, M. Chippaux, and F. Barras.** 1994. Periplasmic disulphide bond formation is essential for cellulase secretion by the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **11**: 545-553.
- Bourson, C., S. Favey, S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1993. Regulation of the expression of a *pelA::uidA* fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of the synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis. *J. Gen. Microbiol.* **172**: 6950-6958.
- Boyer, M. H., B. Cami, J. P. Chambost, M. Magnan, and J. Cattaneo.** 1987. Characterization of a new enoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. *Eur. J. Biochem.* **162**: 311-316.
- Bradbeer, C.** 1993. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3146-3150.
- Breedveld, M. W., L. P. T. M. Zevenhuizen, and A. J. B. Zehnder.** 1990. Excessive excretion of cyclic β -(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2080-2086.
- Breedveld, M. W., L. P. T. M. Zevenhuizen, and A. J. B. Zehnder.** 1991. Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic β -(1,2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1. *Arch. Microbiol.* **156**: 501-506.
- Breedveld, M. W., L. P. T. M. 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.
- 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., and K. J. Miller.** 1994. Cyclic β -glucans of members 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., 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., J. A. Hadley, and K. J. Miller.** 1995b. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**: 6346-6351.
- Briones, G., N. Inon de Iannino, M. Steinberg, and R. A. Ugalde.** 1997. Periplasmic cyclic 1,2- β -glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiol.* **143**: 1115-1124.
- Brooks, A. D., S. Y. He, S. Gold, N. T. Keen, and A. Collmer.** 1990. Molecular cloning of the structural gene for exopolygalacturonate lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product. *J. Bacteriol.* **172**: 6950-6958.
- Broome-Smith, J. K., and B. G. Spratt.** 1986. A vector for the construction of translational fusions to TEM β -lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene.* **49**: 341-349.
- Broome-Smith, J. K., M. Tadayyon, and Y. Zhang.** 1990. β -lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* **4**: 1637-1644.
- Bukau, B., M. Ehrmann, and W. Boos.** 1986. Osmoregulation of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**: 884-891.
- Bundle, D. R., J. W. Cherwonogrodzky, and M. B. Perry.** 1988. Characterization of *Brucella* polysaccharide B. *Infect. Immun.* **56**: 1101-1106.
- Cairney, J., I. R. Booth, and C. F. Higgins.** 1985. Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. *J. Bacteriol.* **164**: 1224-1232.

- Calamita, G., B. Kempf, M. Bonhivers, W. R. Bishai, E. Bremer, and P. Agre.** 1998. Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3627-3631.
- Cangelosi, G. A., G. Martinetti, J. A. Leigh, C. C. Lee, C. Theines, and E. W. Nester** 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **171**: 1609-1615.
- Cangelosi, G. A., G. Martinetti, and E. W. Nester.** 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 2172-2174.
- Castillo, A., and S. Reverchon.** 1997. Characterization of the Pect control region from *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **179**: 4909-4918.
- Castro, O. A., A. Zorreguieta, V. Ielmini, G. Vega, and L. Ielpi.** 1996. Cyclic β -(1,2)-glucan synthesis in *Rhizobiaceae*: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J. Bacteriol.* **178**: 6043-6048.
- Cayley, S., B. A. Lewis, H. J. Guttman, and M. T. Record, Jr.** 1991. Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. *J. Mol. Biol.* **222**: 231-300.
- Chakraborti, A., S. Gunji, N. Shakibai, J. Cubeddu, and L. Rothfield.** 1992. Characterization of the *Escherichia coli* membrane domain responsible for binding *oriC* DNA. *J. Bacteriol.* **174**: 7202-7206.
- Chatterjee, A. K., K. K. Thurn, and D. J. Tyrel.** 1985. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Erwinia chrysanthemi* that are deficient in polygalacturonate catabolic enzymes oligogalacturonate lyase and 3-deoxy-D-glycero-2,5-hexodiulozonate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **162**: 708-714.
- Chou, J., J. T. Greenberg, and B. Demple.** 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* **175**: 1026-1031.
- Clark, D. P.** 1985. Mutant of *Escherichia coli* deficient in osmoregulation of periplasmic oligosaccharide synthesis. *J. Bacteriol.* **161**: 1049-1053.
- Clementz, T., J. J. Bednarski, and C. R. H. Raetz.** 1996. Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A. *J. Biol. Chem.* **271**: 12095-12102.
- Clewell, D. B., and D. R. Helinski.** 1979. Supercoiled circular DNA protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **62**: 1444-1448.
- Cogez, V.** 1997. Recherche de mutants et étude de la voie de biosynthèse des glucanes périplasmiques chez *Rhodobacter sphaeroides*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université des Sciences et Technologies de Lille-Flandres Artois.
- Cohen, J. L., and K. J. Miller.** 1991. A novel membrane-bound glucosyltransferase from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4271-4276.
- Collmer, A., and N. T. Keen.** 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
- Condemine, G., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1986. Isolation of *Erwinia chrysanthemi* *kduD* mutants altered in pectin degradation. *J. Bacteriol.* **165**: 937-941.
- Condemine, G., and J. Robert-Baudouy.** 1987. Tn5 insertion in *kdgR*, a regulatory gene of the polygalacturonate pathway in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **42**: 39-46.
- Condemine, G., and J. Robert-Baudouy.** 1991. Analysis of an *Erwinia chrysanthemi* gene cluster involved in pectin degradation. *Mol. Microbiol.* **5**: 2191-2202.
- Condemine, G., C. Dorel, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1992. Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are coregulated by *KdgR*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3199-3211.
- Condemine, G., and J. Robert-Baudouy.** 1995. Synthesis and secretion of *Erwinia chrysanthemi* virulence factors are coregulated. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 632-636.
- Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464.

- Cronan, J. E., and C. O. Rock.** 1987. Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief). Washington DC: American Society For Microbiology, p. 474-497.
- Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetics responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Csonka, L. N., and W. Epstein.** 1996. Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 1210-1223.
- Dahler, G. S., F. Barras, and N. T. Keen.** 1990. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **172**: 5803-5815.
- Darvill, A. G., and P. Albersheim.** 1984. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275.
- Davis, R. W., D. Botstein, and J. R. Roth.** 1980. A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- De Maagd, R. A., A. S. Rao, I. H. M. Mulders, L. Goosen-de Roo, M. C. M. van Loosdrecht, 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.
- de Smit, M. H., and J. van Duin.** 1994. Translation initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* **235**: 173-184.
- Debarbieux, L., A. Bohin, and J.-P. Bohin.** 1997 Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6692-6698.
- Delcour, A. H., J. Adler, C. Kung, and B. Martinac.** 1992. Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *E. coli* porin channel. *FEBS Lett.* **304**: 216-220.
- Delepelaire, P., and C. Wandersman.** 1990. Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* α -hemolysin. *J. Biol. Chem.* **265**. 17118-17125.
- Delepelaire, P., and C. Wandersman.** 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2427-2434.
- Delepelaire, P.** 1994. PrtD, the integral membrane ATP-binding cassette component of the *Erwinia chrysanthemi* metalloprotease secretion system, exhibits a secretion signal-regulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 27952-27957.
- Delepelaire, P., and C. Wandersman.** 1998. The SecB chaperone is involved in the secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein through an ABC transporter. *EMBO J.* **17**: 936-944.
- 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*. *Carbohydrate Research.* **117**: 185-200.
- Denny, T. P.** 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **58**: 145-161.
- Derouiche, R., M. Gavioli, H. Benedetti, A. Prilipov, C. Lazdunski, and R. Lloubes.** 1996. TolA central domain interacts with *Escherichia coli* porins. *EMBO J.* **15**: 6408-6415.
- Dickstein, R., T. Bisseling, V. N. Reinhold, and F. M. Ausubel.** 1988. Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev.* **2**: 677-687.
- Dijkstra, A. J., and W. Keck.** 1996. peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. bacteriol.* **178**: 5555-5562.

- Donachie, W. D., K. J. Begg, and N. F. Sullivan.** 1984. Morphogenesis of *Escherichia coli*. In R. Losick and L. Shapiro (Ed.), *Microbial development*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., p. 27-62.
- 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.
- Dudman, W. F., and A. J. Jones.** 1980. The extracellular glucans of *Bradyrhizobium japonicum* strain 3I1b71a. *Carbohydr. Res.* **84**: 358-364.
- Dunlap, J., E. Minami, A. A. Bhagwat, D. L. Keister, and G. Stacey.** 1996. Nodule development induced by mutants of *bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic β -glucan synthesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 546-555.
- Duong, F., J. Eicher, A. Price, M. Rice Leonard, and W. Wickner.** 1997. Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell.* **91**: 567-573.
- Dye, D. W.** 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II The "*carotovora*" group. *New Zealand Journal of Science.* **12**: 81-87.
- 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. U.S.A.* **83**: 4403-4407.
- 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., P. Nagpal, D. R. Helinski, and G. S. Ditta.** 1990b. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**: 1409-1417.
- Ebel, J., and H. Grisebach.** 1988. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: a molecular analysis. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 23-27.
- Ebel, W., G. J. Vaughin, H. K. Peters III, and J. E. Trempy.** 1997. Inactivation of MdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6858-6861.
- Enard, C., A. Diolez, and D. Expert.** 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* **170**: 2419-2426.
- Enard, C., T. Franza, C. Neema, P. R. Gill, M. Persmark, J. B. Neilands, and D. Expert.** 1991. The requirement of chrysoactin dependant iron transport for virulence incited by *Erwinia chrysanthemi* on *Saintpaulia ionantha*. *Plant soil.* **130**: 263-271.
- 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.
- Fognini-Lefebvre, N., J. C. Lazzaroni, and R. Portalier.** 1987. *tolA*, *tolB* and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 391-395.
- Fralick, J. A., and L. L. Burns-Keliher.** 1994. Additive effect of *tolC* and *rfa* mutations on the hydrophobic barrier of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**: 6404-6406.
- Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 5803-5805.
- 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. *Parid 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. *Mol. Microbiol.* **173**: 3021-3024.

- Geiger, O., F. D. Russo, T. J. Silhavy, and E. P. Kennedy.** 1992. Membrane-derived oligosaccharides affect porin osmoregulation only in media of low ionic strength. *J. Bacteriol.* **174**: 1410-1413.
- Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1-2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**: 880-884.
- Ghigo, J. M., and C. Wandersman.** 1992. A fourth metalloprotease gene in *Erwinia chrysanthemi*. *Res. Microbiol.* **143**: 857-867.
- Ghigo, J.-M., and C. Wandersman.** 1994. A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. *J. Biol. Chem.* **269**: 8979-8985.
- Glucksmann, M. A., T. L. Reuber, and G. C. Walker.** 1993. Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **175**: 7033-7044.
- Goldberg, D. E., M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1981. The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglycerol transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 5513-5517.
- Gonzales, J. E., G. M. York, G. C. Walker.** 1996. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene.* **179**: 141-146.
- Gore, R. S., and K. J. Miller.** 1993. Cyclic β -1,6-1,3 glucans are synthesized by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids within soybean (*Glycine max*) root nodules. *Plant Physiol.* **102**: 191-194.
- Gottesman, S., and V. Stout.** 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **5**: 1599-1606.
- Gualerzi, C. O., and C. L. Pon.** 1990. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry.* **29**: 5881-5889.
- Guihard, G., P. Boulanger, H. benedetti, R. Llobes, M. Besnard, and L. Letellier.** 1993. Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and the outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 5874-5880.
- Guisseppi, A., J.-L. Aymeric, B. Cami, F. Barras, and N. Creuzet.** 1991. Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene.* **106**: 109-114.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- 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.
- Hasin, M., and E. P. Kennedy.** 1982. Role of phosphatidylethanolamine in the biosynthesis of pyrophosphoethanolamine residues in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**: 12475-12477.
- He, S. Y., and A. Collmer.** 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-polygalacturonosidase-encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **172**: 4988-4995.
- Henikoff, S.** 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene.* **28**: 351-359.
- Higgins, C. F., J. Cairney, D. A. Stirling, L. Sutherland, and I. R. Booth.** 1987. Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? *Trends Biochem. Sci.* **12**: 339-344.
- Hinton, J. C. D., J. M. Sidebotham, L. J. Hyman, M. C. M. Perembelon, and G. P. C. Salmond.** 1989. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* exhibiting reduced virulence. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 141-148.
- Hisamatsu, M., A. Amemura, K. Koizumi, T. Utamura, and Y. Okada.** 1983. Structural studies on cyclic (1-2)- β -D-glucans (cyclosophoraose) 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-acetylated cyclophorans (cyclic β -(1,2)-D-glucans) by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**: 115-122.
- Hisamatsu, M.** 1992. Cyclic (1,2)- β -D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**: 137-146.
- Hoch, J. A., and T. J. Silhavy (ed.).** 1995 Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
- Holmes D. S., and M. Quigley.** 1981. Rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Ann. Rev. Biochem.* **114**: 193.
- Höltje, J.-V., W. Fiedler, H. Rotering, 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.
- Hubbard, J. P., J. William, R. M. Niles, and M. S. Mount.** 1978. The relation between glucose repression and endopolygalacturonate trans-eliminase and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in *Erwinia carotovora*. *Phytopathology.* **68**: 95-99.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., H. Dominguez, and J. Robert-Baudouy.** 1992. Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **174**: 7807-7818.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser, and S. Reverchon, S.** 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 213-257.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy.** 1987. Hexuronate catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **169**: 1223-1231.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy.** 1989. Isolation of *Erwinia chrysanthemi* mutants altered in pectinolytic enzyme production. *Mol. Microbiol.* **3**: 1587-1597.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1989. Expanded linkage map of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol. Microbiol.* **3**: 573-580.
- Hultgren S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. W. St. Geme III, and S. Normark** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell.* **73**: 887-901.
- Hwang, J., X. Zhong, and P. C. Tai.** 1997. Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interact with CvaB and TolC. *J. Bacteriol.* **179**: 6264-6270.
- 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.
- Ingram-Smith, C., and K. J. Miller.** 1998. Effects of ionic and osmotic strength on the glucosyltransferase of *Rhizobium meliloti* responsible for cyclic β -(1,2)-glucan biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1290-1297.
- Inon 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.
- Izard, J. W., and D. A. Kendall.** 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* **13**: 765-773.
- 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., Bohin J.-P., 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.
- Jacques, N., and M. Dreyfus.** 1990. Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. *Mol. Microbiol.* **4**: 1063-1067.

- Ji, J., N. Huguvieux-Cotte-Patta, and J. Robert-Baudouy.** 1987. Use of *Mu-lac* insertions to study the secretion of pectate lyases by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **133**: 793-802.
- Karow, M., and C. Georgopoulos.** 1991. Sequencing, mutational analysis, and transcriptional regulation of the *Escherichia coli htrB* gene. *Mol. Microbiol.* **5**: 2285-2292.
- Keen, N. T., D. Ridgway, and C. Boyd.** 1992. Cloning and characterization of a phospholipase gene from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Mol. Microbiol.* **6**: 179-187.
- Keen, N. T., C. Boyd, and B. Henrissat.** 1996. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 651-657.
- Kennedy, E. P., M. K. Rumley, H. Schulman, and L. M. G. van Golde.** 1976. Identification of *sn*-glycero-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **251**: 4208-4213.
- Kennedy, E. P.** 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 1092-1095.
- Kennedy, E. P., and M. K. Rumley.** 1988. Osmotic regulation of biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2457-2461.
- Kennedy, E. P.** 1996. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 1064-1071.
- 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.
- Klein, W., and W. Boos.** 1993. Induction of the λ receptor is essential for the effective uptake of trehalose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1682-1686.
- Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity. In M. S. Mount and G. H. Lacy (Ed.), *phytopathogenic procaryotes*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, p.149-177.
- Koizumi, K., Y. Okada, S. Horiyama, T. Utamura, M. Hisamatsu, and A. Amemura.** 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.
- 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.
- Kotoujanski, A., M. Lemattre, and P. Boistard.** 1982. Utilization of a thermosensitive episome bearing transposon Tn10 to isolate Hfr donor strains of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **150**: 122-131.
- Kotoujansky, A.** 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 405-430.
- Kuhn, H.-M., U. Meier-Dieter, and H. Mayer.** 1988. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**: 195-222.
- Kyte J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Lacroix, J.-M., E. Lanfroy, V. Coge, A. Bohin, S. Pille, et J.-P. Bohin.** Résultats non publiés.
- 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.

- 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.
- 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.
- Lanfroy, E., and J. -P. Bohin.** 1993. Physical map location of the *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I. *J. Bacteriol.* **175**: 5736-5737.
- Lanfroy, E.** 1997. La substitution des glucanes périplasmiques osmorégulés d'*Escherichia coli*. Thèse de Docteur en Sciences, Université de Paris XI Orsay.
- Larsen, P.I., L. K. Sydnnes, B. Landfald, and A. R. Strom.** 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147**: 1-7.
- Laurent, F., A. Kotoujansky, G. Labesse, and Y. Bertheau.** 1993. Characterization and overexpression of the *pem* gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene.* **131**: 17-25.
- 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. U.S.A.* **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.
- Leigh, J. A., and D. L. Coplin.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 307-346.
- Lequette, Y.** 1998. Deux gènes contrôlant des réarrangements des molécules de glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université des Sciences et Technologies de Lille-Flandres Artois.
- Létoffé, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman.** 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* **9**: 1375-1382.
- Létoffé, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman.** 1996. Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *EMBO J.* **15**: 5804-5811.
- Link, A. J., K. Robinson, and G. M. Church.** 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis.* **18**: 1259-1313.
- Lisser, S., and H. Margalit.** 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1507-1516.
- Liu, Y., A. Chatterjee, and A. K. Chatterjee.** 1994. Nucleotide sequence, organization and expression of *rdgA* and *rdgB* genes that regulate pectine lyase production in the plant pathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in response to DNA-damaging agents. *Mol. Microbiol.* **14**: 999-1010.
- Liu, M. Y., H. Yang, and T. Romeo.** 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* **177**: 2663-2672.
- Lojkowska, E., C. Dorel, P. Reignault, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1993. Use of GUS fusions to study the expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes during infection of potato tubers. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 488-494.
- Lojkowska, E., C. Masclaux, M. Boccara, J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1995. Characterization of the *pell* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **16**: 1183-1195.
- 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., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohin.** 1992. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. In Proc. 8th Int. Conf. Plant Pathog. Bact., Versailles, France.
- Loubens, I.** 1993. Biosynthèse des glucanes périplasmiques des bactéries à Gram négatif : le locus *mdoA* d'*Escherichia coli* et ses homologues chez *Pseudomonas syringae* et *Shigella flexneri*. Thèse de Docteur en Sciences, Université de Paris XI Orsay.
- 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 pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. Mol. Microbiol. **10**: 329-340.
- Lugowski, C., E. Romanowska, L. Kenne, and B. Lindberg.** 1983. Identification of a trisaccharide repeating-unit in the enterobacterial common antigen. Carbohydr. res. **118**: 173-181.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**: 6299-6313.
- Ma, D., D. N. Cook, J. E. Hearst, and H. Nikaido.** 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol. **2**: 489-493.
- Mahe, B., C. Masclaux, L. Rauscher, C. Enard, and D. Expert.** 1995. Differential expression of two siderophore-dependent iron-acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. Mol. Microbiol. **18**: 33-43.
- Maloy, S., and V. Stewart.** 1993. Autogenous regulation of gene expression. J. Bacteriol. **175**: 307-316.
- Manson, M. D., J. P. Armitage, J. A. Hoch, and R. M. Macnab.** 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. J. Bacteriol. **180**: 1009-1022.
- Masclaux, C., and D. Expert.** 1995. Signalling potential of iron in plant-microbe interactions: the pathogenic switch of iron transport in *Erwinia chrysanthemi*. Plant Journal. **7**: 121-128.
- Masclaux, C., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and D. Expert.** 1996. Iron is triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyase in pathogenesis of African violets. Mol. Plant Microbe Interact. **9**: 198-205.
- McCarthy, J. E. G., and C. Gualerzi.** 1990. Translational control of prokaryotic gene expression. Trends Genet. **6**: 78-85.
- 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., 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., 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.
- 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, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, K. J., and R. S. Gore.** 1992. Cyclic beta-1,6 -1,3 glucans of *Bradyrhizobium*: functional analogs of the cyclic beta-1,2-glucans of *Rhizobium*. Curr. Microb. **24**: 101-104.
- Miller, K. J., J. A. Hadley, and D. L. Gustine.** 1994. Cyclic β -1,6-1,3-glucans of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 elicit isoflavonoid production in the soybean (*Glycine max*) host. Plant Physiol. **104**: 917-923.

- Mills, D., and F. Niepold.** 1987. Molecular analysis of pathogenesis of *P. syringae* pv. *syringae*. In S. Nishimura, C. P. Vance, and N. Doke (Ed.), Molecular determinants of plant diseases, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 185-200.
- Minton, N. P.** 1984. Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *Gene*. **31**: 269-273.
- Mithöfer, A., A. A. Bhagwat, M. Feger, and J. Ebel.** 1996. Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta*. **199**: 270-275.
- Mizuno, T., and S. Mizushima.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**: 1077-1082.
- Moran, F., S. Nasuno, and M. P. Starr.** 1968. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid transeliminases of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**: 293-306.
- Morris, V. J., G. J. Brownsey, G. R. Chilvers, J. E. Harris, A. P. Gunning, and B. H. J. Stevens.** 1991. Possible biological roles for *Rhizobium leguminosarum* extracellular polysaccharide and cyclic glucans in bacteria-plant interactions for nitrogen-fixing bacteria. *Food Hydrocoll.* **5**: 185-188.
- Moulard, M., G. Condemine, and J. Robert-Baudouy.** 1993. Characterization of the *nucM* gene coding for a nuclease of the phytopathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **8**: 685-695.
- Mourez, M., M. Hofnung, and E. Dassa.** 1997. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J.* **16**: 3066-3077.
- Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange, and R. Hengge-Aronis.** 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1607-1613.
- Mukhopadhyay, P., J. Williams, and D. Mills.** 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **170**: 5479-5488.
- Munro, G. F., K. Hercules, J. Morgan, and W. Sauerbier.** 1972. Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**: 1272-1280.
- 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.
- Nasser, W., G. Condemine, R. Plantier, D. Anker, and J. Robert-Baudouy.** 1991. Inducing properties of analogs of 2-keto-3-deoxygluconate on the expression of pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 73-78.
- Nasser, W., S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy.** 1992. Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major represso of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **6**: 257-265.
- Nasser, W., S. Reverchon, G. Condmine, and J. Robert-Baudouy.** 1994. Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *J. Mol. Microbiol.* **236**: 427-440.
- Nasser, W., J. Robert-Baudouy, and S. Reverchon.** 1997. Antagonistic effect of Crp and KdgR in the transcription control of the *Erwinia chrysanthemi* pectinolysis genes. *Mol. Microbiol.* **26**: 1071-1082.
- Neema, C., J.-P. Laulhere, and D. Expert.** 1993. Iron deficiency induced by chrysobactin in Saintpaulia leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.* **102**: 967-973.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their clivage sites. *Protein Eng.* **10**: 1-6.
- Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 5853-5859.

- Nikaido, H.** 1996. Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 29-47.
- Ninfa, A. J.** 1996. Regulation of gene transcription by extracellular stimuli. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 1246-1262.
- O'Connell, K. P., and J. Handelsman.** 1989. *chvA* locus may be involved in export of neutral celiac beta-1,2-linked D-glucan from *agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2**: 11-16.
- Okada, Y., M. Wachi, A. Hirata, K. Suzuki, K. Nagai, and M. Matsuhashi.** 1994. Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* **176**: 917-922.
- Olivier, D. B.** 1996. Periplasm. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 88-103.
- Ophir, T., and D. L. Gutnick.** 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 740-745.
- Park, J. T.** 1996. The murein sacculus. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 48-57.
- Perego, M., P. Glaser, and J. Hoch.** 1996. Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 1151-1157.
- Perembelon, M. C. M., and A. Kelman.** 1980. Ecology of the soft rot *erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 361-387.
- Persmark, M., D. Expert, and J. B. Neilands.** 1989. Isolation, characterization and synthesis of chrysoabactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* **264**: 3187-3193.
- Pissavin, C., J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1996. Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **178**: 7187-7196.
- Platt, T.** 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 339-372.
- Postle, K.** 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 591-601.
- Praillet, T., W. Nasser, J. Robert-Baudouy, and S. Reverchon.** 1996. Purification and functional characterization of PecS, a regulator of virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **20**: 391-402.
- Praillet, T., S. Reverchon, and W. Nasser.** 1997. Mutual control of the PecS/PecM couple, two proteins regulating virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **24**: 803-814.
- Pratt, L. E., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy.** 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**: 911-917.
- Preston, J. F., J. D. Rice, L. O. Ingram, and N. T. Keen.** 1992. Differential depolymerization mechanisms of pectate lyases secreted by *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **174**: 2039-2042.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
- Puvanesarajah, V., F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, and E. W. Nester.** 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**: 102-106.

- Py, B., G. P. C. Salmond, M. Chippaux, and F. Barras.** 1991. Secretion of cellulases in *Erwinia chrysanthemi* and *E. carotovora* is species-specific. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**: 315-322.
- Py, B., M. Chippaux, and F. Barras.** 1993. Mutagenesis of cellulase *Egz* for studying the general protein secretory pathway in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **7**: 785-793.
- Raetz, C. R. H.** 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 253-295.
- Resibois, A., M. Colet, M. Faelen, M. Schoonejans, and A. Toussaint.** 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology.* **137**: 102-112.
- Reverchon, S., N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, C. Bourson, C. Arpin, and J. Robert-Baudouy.** 1990. Pectinolysis regulation in *Erwinia chrysanthemi*. In *Plant Pathogenic Bacteria*, Z. Klement (Ed.), Budapest : Akadémiai Kiado, p. 739-744.
- Reverchon, S., W. Nasser, and J. Robert-Baudouy.** 1994. *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **11**: 1127-1139.
- Reverchon, S., D. Expert, J. Robert-Baudouy, and W. Nasser.** 1997. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **179**: 3500-3508.
- Ried, J. L., and A. Collmer.** 1988. Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletion in all the the pectate lyase structural genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**: 32-38.
- Rigal, A., E. Bouveret, R. Lloubes, C. Lazdunski, and H. Benedetti.** 1997. The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 7274-7279.
- Ringquist, S., S. Shinedling, D. Barrick, L. Green, J. Binkley, G. D. Stormo, and L. Gold.** 1992. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* **6**: 1219-1229.
- Roeder, D. L., and C. Collmer.** 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **164**: 51-56.
- 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 -(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta.* **1116**: 215-225.
- Romeo, T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**: 1321-1330.
- Rotering, H., W. Fiedler, W. Rollinger, and V. Braun.** 1984. Procedure for 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. Thérissod, 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.
- Saarihahti, H. T., M. Pirhonen, M. B. Karlsson, D. Flego, and E. T. Palva.** 1992. Expression of *pehA-bla* gene fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and isolation of regulatory mutants affecting polygalacturonase production. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 81-88.
- Saint, N., E. De, S. Julien, N. Orange, and G. Molle.** 1993. Ionophore properties of OmpA of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1145**: 119-123.
- Salmond, G. P. C.** 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 181-200.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.

- Sauvage, C., and D. Expert.** 1994. Differential regulation by iron of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: pathogenicity of iron transport regulatory (*cbr*) mutants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 71-77.
- Sawai, T., S. Hirano, and Y. Yamaguchi.** 1987. Repression of porin synthesis by salicylate in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. lett.* **40**: 233-237.
- Schnaitman, C. A., and J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.
- 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.
- Schoonejans, E., D. Expert, and A. Toussaint.** 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysanthemi* lipopolysaccharide-defective, Φ EC2-resistant Mutants. *J. Bacteriol.* **169**: 4011-4017.
- Schulman, H., and E. P. Kennedy.** 1977. Relation of turnover of membrane phospholipids to synthesis of membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 4250-4255.
- 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 envelope of *Escherichia coli* and their occurrence in other Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **137**: 686-688.
- Sen, K., J. Hellman, and H. Nikaido.** 1988. Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **263**: 1182-1187.
- Serrano, A. M., G. Franco-Rodriguez, I. Gonzalez-Jimenez, P. Tejero-Mateo, J. M. Molina, J. A. Dobado, M. Megias, and 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.
- Sharp, J. K., M. McNeil, and P. Albersheim.** 1984. The primary structure of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11321-11336.
- Shevchik, V. E., A. N. Evtushenkov, H. V. Babitskaya, and Y. K. Fomichev.** 1992. Production of pectinolytic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 115-120.
- Shevchik, V. E., I. Brtoli-German, J. Robert-Baudouy, S. Robinet, F. Barras, and G. Condemine.** 1995. Differential effect of DsbA and DsbC mutations on extracellular enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **16**: 745-753.
- Shevchik, V. E., G. Condemine, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J. Robert-Baudouy.** 1996. Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **19**: 455-466.
- Shevchik, V. E., J. Robert-Baudouy, and G. Condemine.** 1997. Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J.* **16**: 3007-3016.
- Shevchik, V. E., J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1997a. Pectate lyase *pell* of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *J. Bacteriol.* **179**: 7321-7330.
- Shevchik, V. E., and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1997b. Identification of bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **24**: 1285-1301.
- Silhavy, T. J., M. N. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Singer M., T. A. Baker, G. Schnitzler, S. M. Deischel, M. Goel, W. Dove, K. J. Jaacks, and A. D. Grossman, J.** 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **53**: 1-24.
- Slauch, J. M., and T. J. Silhavy.** 1991. Cis-acting *ompF* mutations that result in OmpR-dependent constitutive expression. *J. Bacteriol.* **173**: 4039-4048.

- Sledjeski, D., and S. Gottesman.** 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**: 1204-1206.
- Smit, G., S. Swart, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* **6**: 2897-2903.
- Smith, A. R. W., S. M. Munro, R. Wait, and R. C. Hignett.** 1994. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolate of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. *Microbiology-UK.* **140**: 1585-1593.
- Smith, A. R. W., R. A. Rastall, P. Blake, and R. C. Hignett.** 1995. Gluco-oligosaccharide production by a strain of *Erwinia amylovora*. *Microbios.* **83**: 27-39.
- Soto, M. J., V. Lepek, J. Olivares, and N. Toro.** 1993. Accumulation of cell-associated β -(1,2)-glucan in *Rhizobium meliloti* strain GR4 in response to osmotic potential. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 11-14.
- Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoprotein. *Methods Enzymol.* **8**: 3-26.
- Spratt, B. G.** 1983. Penicillin-binding proteins and the future of β -lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1247-1260.
- Sprengart, M. L., and A. G. Porter.** 1997. Functional importance of RNA interactions in selection of translation initiation codons. *Mol. Microbiol.* **24**: 19-28.
- Stanfield, S. W., L. Ielpi, D. O'Brochta, D. R. Helinski, and G. S. Ditta.** 1988. The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1,2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* **170**: 3523-3530.
- Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs, and P. R. Reeves.** 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* **178**: 4885-4893.
- Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 7850-5861.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and the regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
- Stock, J. B., and M. G. Surette.** 1996. Chemotaxis. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p. 1103-1129.
- Stout, V., and S. Gottesman.** 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 659-669.
- Stout, V., A. Torres-Cabassa, M. R. Maurizi, D. Gutnick, and S. Gottesman.** 1991. RscA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J. Bacteriol.* **173**: 1738-1747.
- Sugawara, E., and H. Nikaido.** 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 2507-2511.
- Surgey, N., J. Robert-Baudouy, and G. Condemine.** 1996. The *Erwinia chrysanthemi* Pect gene regulates pectinase gene expression. *J. Bacteriol.* **178**: 1593-1599.
- 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.
- 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.
- Szejtli, J.** 1990. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydr. Res.* **12**: 375-392.
- 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.** 1996. Cell associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **178**: 2263-2271.
- Talaga, P.** 1996. Les glucanes périplasmiques osmorégulés : structure et biodiversité. Thèse de Docteur en Sciences, Université des Sciences et Technologies de Lille-Flandres Artois.
- Tang, L., A. C. Weissborn, and E. P. Kennedy.** 1997. Domains of *Escherichia coli* acyl carrier protein important for membrane-derived-oligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 3697-3705.
- Tardy, F., W. Nasser, J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat.** 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J. Bacteriol.* **179**: 2503-2511.
- Teather, R. M., and P. J. Wood.** 1982. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 777-780.
- Temseh, M., Y. Bertheau, and B. Vian.** 1991. Pectate lyase fixation and pectate disorganization visualized by immunochemistry in *Saintpaulia ionantha* infected by *Erwinia chrysanthemi*. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**: 611-620.
- Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2512-2518.
- Therisod, 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. U.S.A.* **83**: 7236-7240.
- Therisod, 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. U.S.A.* **84**: 8235-8238.
- Thurn, K. K., and A. K. Chatterjee.** 1985. Single-site chromosomal Tn5 insertions affect the export of pectolytic and cellulolytic enzymes in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 894-898.
- Torriani, A.** 1968. Alkaline phosphatase subunits and their dimerization in vivo. *J. Bacteriol.* **96**: 1200-1207.
- Tsung, K., R. E. Brissette, and M. Inouye.** 1990. Enhancement of RNA polymerase binding to promoters by a transcriptional activator, OmpR, in *Escherichia coli* : its positive and negative effects on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 5940-5944.
- Tsuyumu, S.** 1979. "Self catabolite repression" of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* **137**: 1035-1036.
- Tsuyumu, S., and A. K. Chatterjee.** 1984. Pectin lyase production in *Erwinia chrysanthemi* and other soft-rot *Erwinia* species. *Physiol. Plant Pathol.* **24**: 291-302.
- Tully, R.E., D. L. Keister, and K. C. Gross.** 1990. Fractionation of the β -linked glucans of *Bradyrhizobium japonicum* and their response to osmotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1518-1522.
- Ueguchi, C., and K. Ito.** 1992. Multicopy suppression: an approach to understanding intracellular functioning of the protein export system. *J. Bacteriol.* **174**: 1451-1461.
- Ulbrandt, N. D., J. A. Newitt, and H. D. Bernstein.** 1997. The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell.* **88**: 187-196.
- Vaara, M.** 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2255-2260.
- Valent, Q. A., J.-W. L. de Gier, G. von Heijne, D. A. Kendall, C. M. ten Hagen-Jongman, B. Oudega, and J. Luirink.** 1997. Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol. Microbiol.* **25**: 53-64.
- van Gijsegem, F., and A. Toussaint.** 1983. In vivo cloning of *Erwinia carotovora* genes involved in the catabolism of hexuronates. *J. Bacteriol.* **154**: 1227-1235.

- Van Gijsegem, F., and A. Toussaint.** 1983. In vivo cloning of *Erwinia carotovora* genes involved in the catabolism of hexuronates. *J. Bacteriol.* **154**: 1227-1235.
- van Gijsegem, F., A. Toussaint, and E. Schoonejans.** 1985. In vivo cloning of pectate lyase and cellulase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *EMBO J.* **4**: 787-792.
- Van Gijsegem, F., S. Genin, and C. Boucher.** 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* **1**: 175-180.
- van Golde, L. M., 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. U.S.A.* **70**: 1368-1372.
- Van Veen, R. J. M., H. den Dulk-Ras, R. A. Schilperoort, and P. J. J. Hooykaas.** 1987. Chromosomal nodulation genes: sym-plasmid containing *Agrobacterium* strains need chromosomal virulence genes (*chvA* and *chvB*) for nodulation. *Plant Mol. Biol.* **8**: 105-108.
- Vanden Boom, T., and J. E. Cronan, Jr.** 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 317-343.
- Vieira, J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**: 259-268.
- von Hippel, P. H., D. G. Bear, W. D. Morgan, and J. A. McSwiggen.** 1984. Protein-nucleic acid interactions in transcription : a molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 389-446.
- von Hippel, P. H., and T. D. Yager.** 1992. The elongation-termination decision in transcription. *Science.* **255**: 809-812.
- Wandersman, C., P. Delepelaire, S. létoffé, and M. Schwartz.** 1987. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 5046-5053.
- Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for haemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4776-4780.
- Wandersman, C., and S. Létoffé.** 1993. Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of *Escherichia coli* α -haemolysin and *Erwinia chrysanthemi* proteases. *Mol. Microbiol.* **7**: 141-150.
- Wandersman, C.** 1996. Secretion across the outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F. C. (Ed. in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society For Microbiology, p.955-965.
- 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.
- Weissborn, A. C., M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1992. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in production of membrane-derived oligosaccharides. *J. Bacteriol.* **174**: 4856-4859.
- 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.
- Yager, T. D., and P. H. von Hippel.** 1991. A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **30**: 1097-1118.
- Yang, W. C., H. C. J. Canter Cremers, P. Hogendijk, P. Katinakis, C. A. Wijffelman, H. Franssen, A. van Kammen, and T. Bisseling.** 1992. In-situ localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant J.* **2**: 143-151.
- 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.

- York, W. S.** 1995. A conformational model for cyclic β -(1,2)-linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**: 205-225.
- Zevenhuisen, L. P. T. M., and A. R. W. Van Neerven.** 1983. (1,2)- β -D-Glucan and acidic oligosaccharides produced by *Rhizobium meliloti*. *Carbohydr. Res.* **118**: 127-134.
- Zevenhuisen, L. P. T. M., and H. J. Scholten-Koerselman.** 1979. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. I. β -1,2-glucans. *Antonie Leeuwenhoek.* **45**: 165-175.
- Zevenhuisen, L. P. T. M.** 1986. Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium trifolii* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**: 43-47.
- Zevenhuisen, L. P. T. M., A. van Veldhuizen, and R. H. Fokkens.** 1990. Re-examination of cellular cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-1-phosphate substitution. *Antonie van Leeuwenhoek.* **57**: 173-178.
- Zevenhuisen, L. P. T. M.** 1990. Recent developments in *Rhizobium* polysaccharides. In E. A. Dawes (Ed.). *Novel biodegradable microbial polymers*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 387-402.
- 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.
- Zorreguieta, A., and R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1-2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**: 947-951.
- Zorreguieta, A., R. A. Geremia, S. Cavaignac, G. A. Cangelosi, E. W. Nester, and R. A. Ugalde.** 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant Microbiol. Interact.* **1**: 121-127.
- Zorreguieta, 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.

