

Université des Sciences et Technologies de Lille

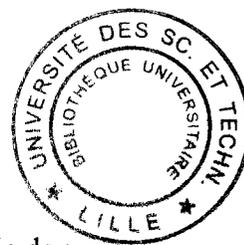
THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par **Virginie COGEZ**

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

**Relations entre structure et fonctions
des glucanes périplasmiques osmorégulés
chez les Protéobactéries**



Présentée le 15 juin 2001, devant la commission d'examen composée de :

Président :	Dr Jean-Claude MICHALSKI
Rapporteurs :	Dr Jean-Claude LAZZARONI Dr Dominique MENGIN-LECREULX
Examineurs :	Pr Ulla BONAS Pr Michel SIMONET
Directeur de thèse :	Pr Jean-Pierre BOHIN

"Il y a pire que ne pas savoir, c'est de croire qu'on sait."

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Jean-Pierre Bohin dans le laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle (UMR8576 CNRS/USTL) à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer à l'étude de ce travail : le Dr Jean-Claude Lazzaroni et le Dr Dominique Mengin-Lecreux en tant que rapporteurs ; le Pr Ulla Bonas et le Pr Michel Simonet en tant qu'examineurs ; et le président du jury le Dr Jean-Claude Michalki.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant contribué à sa réalisation.

Je remercie le personnel de l'UMR8576 pour leur soutien technique et leurs conseils.

Je remercie les personnes qui ont collaboré à ce travail : Jérôme Lemoine (UMR8576) qui a réalisé les analyses en spectrométrie de masse ; Guy Lippens et Jean-Michel Wieruszski (UMR8525, IBL), qui ont réalisé les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire ; Samuel Kaplan, Agnes Puskas et Evgueni Gak (Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire de l'Université du Texas, Houston, USA) qui ont réalisé une partie des travaux sur *Rhodobacter sphaeroides* ; Bertrand Dehorter (Laboratoire de cryptogamie et phytopathologie, SN2, USTL) et Irina Sadvoskaya (Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Université du Littoral, Boulogne-sur-Mer) qui ont participé à la recherche d'endoglucanase.

Je remercie Jean-Pierre Bohin de m'avoir donné l'occasion de faire une thèse au sein de son groupe et de m'avoir conseillé sur mes travaux de recherches. Je remercie également l'ensemble des membres du groupe de Génétique des Enveloppes Bactériennes présents ou anciens : Anne, Jean-Marie, Carmen, Yannick, Claudine, Laurival, Michael, Rodolphe, Philippe, Guy, Laurent, Eric, Frédéric, et Silvia ; pour leur aide, leur sympathie, et les nombreux échanges techniques et discussions. Je remercie aussi Anne pour ses kouglofs, galettes, gâteaux, biscuits, chocolat..., et particulièrement Jean-Marie Lacroix pour ces conseils et critiques pertinentes. Je remercie également Brigitte pour son aide.

Enfin, je remercie :

Les étudiants qui ont participé à ce travail : Claire, Caroline, Maina, Nouzha et Pierre.

Ma famille, et en particulier, mon grand-père, mes sœurs et ma mère.

David pour son aide précieuse et son amour.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	8
INTRODUCTION	8
I L'ENVELOPPE DES BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF	8
I.1 LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	8
I.1.1 <i>La bicouche lipidique</i>	8
I.1.2 <i>Fonctions assurées par la membrane cytoplasmique</i>	9
I.2 LA MEMBRANE EXTERNE.....	10
I.2.1 <i>La bicouche lipidique : LPS et phospholipide</i>	10
I.2.2 <i>Les protéines associées et leurs fonctions</i>	11
I.3 LE PÉRIPLASME.....	13
I.3.1 <i>La structure du périplasme</i>	13
I.3.2 <i>Le saccule de muréine</i>	15
I.3.3 <i>La physiologie du périplasme</i>	16
I.3.4 <i>Les protéines périplasmiques et leurs fonctions</i>	17
I.4 LES COUCHES ET STRUCTURES ASSOCIÉES À L'ENVELOPPE.....	18
I.4.1 <i>Exopolysaccharides</i>	18
I.4.2 <i>La couche-S</i>	19
I.4.3 <i>Les flagelles</i>	20
I.4.4 <i>Les pilis</i>	20
II GLYCOBIOLOGIE DES INTERACTIONS BACTÉRIE-ENVIRONNEMENT	21
II.1 LES EXOPOLYSACCHARIDES.....	21
II.1.1 <i>Rôle de la capsule dans l'écosystème extérieur</i>	21
II.1.2 <i>Rôle de la capsule dans les interactions avec l'animal</i>	22
II.1.3 <i>Rôle de la capsule dans les interactions avec la plante</i>	22
II.2 LA COUCHE-S ET LES GLYCOPROTÉINES SÉCRÉTÉES OU ASSOCIÉES À L'ENVELOPPE.....	24
II.3 LE LPS : LIPOPOLYSACCHARIDE.....	25
II.3.1 <i>Fonction du LPS</i>	25
II.3.2 <i>Rôle du LPS dans les interactions avec l'animal</i>	25
II.3.3 <i>Rôle du LPS dans les interactions avec la plante</i>	26
II.4 LES FACTEURS NOD	26
II.5 LES OPG : GLUCANES PÉRIPLASMIQUES OSMORÉGULÉS.....	28
II.6 BUT DE CE TRAVAIL	28
III LES GLUCANES PÉRIPLASMIQUES OSMORÉGULÉS	28
III.1 LES STRUCTURES DES OPG	29
III.1.1 <i>Les quatre familles structurales</i>	29
III.1.2 <i>La substitution des OPG</i>	30
III.2 LES GÈNES ET LA BIOSYNTÈSE DES OPG.....	32
III.2.1 <i>La biosynthèse des OPG de la famille I</i>	32
III.2.2 <i>La biosynthèse des OPG de la famille II</i>	33
III.2.3 <i>La biosynthèse des OPG de la famille III</i>	34
III.2.4 <i>Le transfert des substituants sur les OPG</i>	34
III.3 LA RÉGULATION DE LA BIOSYNTÈSE DES OPG	35
III.4 LES FONCTIONS ATTRIBUÉES AUX OPG.....	37
III.4.1 <i>Les phénotypes pléiotropes des mutants Opg⁻</i>	37
III.4.2 <i>L'importance de la structure pour la fonction</i>	39

III.4.3 La réversion des phénotypes des souches <i>Opg⁻</i>	40
III.4.4 Les hypothèses formulées quant à la fonction des OPG	42
RESULTATS	45
PARTIE I : LES GÈNES DE BIOSYNTÈSE DES OPG DE LA FAMILLE IV CHEZ <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	46
A DETERMINATION STRUCTURALE DES OPG PRODUITS PAR <i>R. SPHAEROIDES</i> (RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 1)	47
B LES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA SYNTHÈSE DES OPG CHEZ <i>R. SPHAEROIDES</i> (RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 2).....	51
C LE GÈNE IMPLIQUÉ DANS LA SUBSTITUTION DES OPG PAR LE SUCCINYLE CHEZ <i>R. SPHAEROIDES</i> . (RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 3)	54
D DISCUSSION.....	59
1 La diversité des gènes impliqués dans la synthèse du squelette des OPG	59
2 Mécanisme de biosynthèse.....	59
3 Fonction du gène <i>opgI</i> dans la biosynthèse.....	62
4 Organisation des génomes de <i>R. sphaeroides</i> et <i>R. capsulatus</i>	63
PARTIE II : RELATIONS ENTRE STRUCTURE ET FONCTIONS DES OPG DE LA FAMILLE I.....	67
A CARACTÉRISATION DES OPG D' <i>ERWINIA CHRYSANTHEMI</i> (RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 4)	68
B L'OPG-SUCCINYLTRANSFÉRASE D' <i>E. COLI</i> ET RECHERCHE DE SON HOMOLOGUE CHEZ <i>E. CHRYSANTHEMI</i>	70
1 L'OPG-succinyltransférase d' <i>E. coli</i> (RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 5)	70
2 Recherche de la succinyltransférase d' <i>E. chrysanthemi</i>	73
a Recherche par clonage <i>in vivo</i> au voisinage de <i>opgGH</i>	74
b PCR avec amorces dégénérées	74
c Mutagenèse par insertion de Tn5-B21 et crible des clones par analyse des OPG sur chromatographie sur couche mince.	75
d Existence d'un substituant non soupçonné sur les OPG d' <i>E. chrysanthemi</i>	75
3 Expression hétérologue du gène <i>mdoB</i> d' <i>E. coli</i> chez <i>E. chrysanthemi</i>	76
C RECHERCHE DE SUPPRESSEURS DES MUTATIONS OPG ⁻ CHEZ <i>E. CHRYSANTHEMI</i>	78
1 Mutations restaurant la croissance sur sels biliaires.....	78
2 Mutations restaurant la motilité.....	79
D DISCUSSION.....	81
1 La sécrétion des OPG.....	81
2 Les gènes impliqués dans la substitution des OPG	82
3 Mutations suppressives des phénotypes <i>Opg⁻</i>	84
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	86
MATERIELS ET METHODES	88
A. SOUCHES ET MILIEUX	88
1. Génotype des souches et plasmides utilisés.	88
2. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries	88
B. TECHNIQUES GENETIQUES	89
1. Transduction.....	89
2. Conjugaison.....	89
a) Isolement de R-prime	89
b) Transfert ectopique du gène <i>mdoB</i>	89
3. Transformation	89
4. Mutagenèse par la N'-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine.....	90
5. Recombinaison sur le chromosome	90
C. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	90
1. Extraction et purification d'ADN	90
2. Enzymes de restriction et de modification	90
3. Electrophorèse	91
4. Délétion par l'exonucléase III.....	91
5. Séquençage nucléotidique	92
6. Réaction de polymérisation en chaîne PCR.....	92
D. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	93
1. Dosage des OPG chez <i>E. coli</i>	93
2. Extraction rapide des OPG à l'éthanol.....	94
3. Purification des OPG.....	94

4. <i>Dosage des succinates</i>	94
5. <i>Détection des activités enzymatiques sur boîte de Petri</i>	95
6. <i>Dosage des protéines</i>	95
E. TESTS DE VIRULENCE.....	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
ANNEXES	118
ANNEXE 1 : ARTICLE 1.....	118
ANNEXE 2 : ARTICLE 2.....	118
ANNEXE 3 : ARTICLE 3.....	118
ANNEXE 4 : ARTICLE 4.....	118
ANNEXE 5 : ARTICLE 5.....	118

INTRODUCTION

I L'ENVELOPPE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif comporte deux membranes : la membrane cytoplasmique (ou interne) et la membrane externe. Ces deux membranes définissent un compartiment appelé périplasme (Fig I-1). La description des différents composants de l'enveloppe révèle son rôle primordial. Cette description se base essentiellement sur l'étude d'*Escherichia coli*.

I.1 La membrane cytoplasmique

Formée par l'association de phospholipides et de protéines, la membrane cytoplasmique constitue une barrière sélective qui sépare l'intérieur de la cellule (cytoplasme) de son environnement. Les nombreuses protéines déterminent le transport sélectif, la perception de l'environnement et les propriétés métaboliques.

I.1.1 La bicouche lipidique

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 phospholipides fournissent également un environnement favorable au fonctionnement des complexes protéiques membranaires.

Trois types de phospholipides entrent dans la composition de la membrane interne : la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG) et le cardiolipide ou diphosphatidylglycérol (CL). La proportion de chacun de ces phospholipides varie en fonction des souches et des conditions de croissance. Chez *E. coli*, les proportions varient dans les fourchettes suivantes : PE 70-80%; PG 15-25%, CL 5-10% (Van den Boom et Cronan, 1989). Les phospholipides s'organisent spontanément en bicouches : l'association de deux couches permet d'enfouir les chaînes hydrophobes des résidus d'acyl et d'exposer les têtes polaires vers

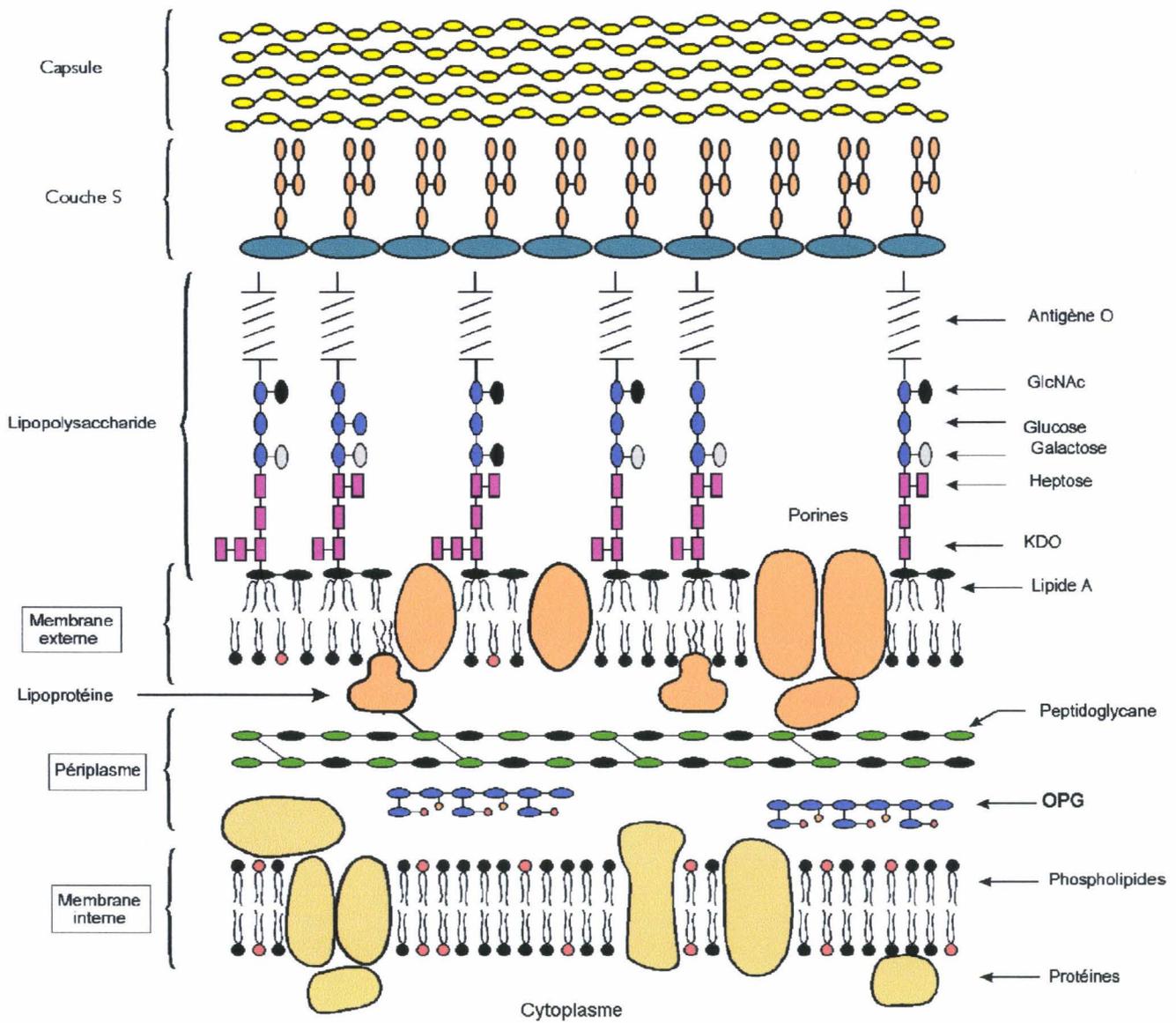


Figure I-1: schéma de l'enveloppe et des couches associées (d'après Raetz, 1996).

le milieu aqueux. Les acides gras greffés au glycérol sont essentiellement : l'acide palmitique, l'acide palmitoléique et l'acide cis-vaccénique (Kadner, 1996).

La composition en phospholipides de la membrane interne a une influence sur son interaction avec des protéines cytoplasmiques ou sur la mise en conformation de protéines membranaires intégrées. La perturbation de la composition naturelle en phospholipides de la membrane cytoplasmique peut affecter diverses fonctions telles que : la réplication du chromosome, la translocation de protéines, la motilité, la résistance aux antibiotiques... (Dowhan, 1992 ; Kadner, 1996).

Les phospholipides de la membrane sont également des précurseurs d'autres composés. En effet, ils peuvent servir de substrat donneur pour le transfert de phosphoéthanolamine sur le lipopolysaccharide (Hasin et Kennedy, 1982), de phosphoglycérol sur la lipoprotéine de Braun, et du phosphoglycérol et de la phosphoéthanolamine sur les OPG (Osmoregulated Periplasmic Glucan) d'*E. coli* (van Golde et coll., 1973; Miller et Kennedy, 1987).

I.1.2 Fonctions assurées par la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique assure un nombre considérable de fonctions : production d'énergie, transport de nutriment et de métabolites, translocation des macromolécules de l'enveloppe, transduction des signaux environnementaux. De plus, la membrane interne sert d'ancrage à la base du moteur actionnant les flagelles et intervient dans la réplication et la ségrégation des chromosomes. Enfin, la synthèse du lipopolysaccharide (LPS), des phospholipides, du peptidoglycane, des exopolysaccharides, et des OPG siègent au niveau de la membrane interne (Kadner, 1996).

L'insertion de certaines protéines dans la membrane interne nécessite le complexe ribonucléoprotéique SRP (Signal Recognition Particle). La glucosyl-transférase, MdoH d'*E. coli* qui participe à la synthèse des OPG est insérée dans la membrane via une reconnaissance par le complexe SRP (Ulbrandt et coll., 1997 ; Valent et coll., 1997).

Le système Sec permet la translocation à travers la membrane interne des protéines du périplasma, de la membrane externe et de certaines protéines de la membrane interne possédant un large domaine périplasmique (Andersson et von Heijne, 1993).

Trois voies principales sont décrites pour la sécrétion des protéines (Pugsley, 1993 ; Wandersman, 1996). Le système de sécrétion de type I comprend trois protéines : un

transporteur ABC (ATP Binding Cassette), une protéine de la membrane interne MFP (Membrane Fusion Protein) et une protéine de la membrane externe. Ce mode de sécrétion est utilisé, par exemple chez *E. coli*, pour la sécrétion de l'hémolysine ou chez *E. chrysanthemi* pour la sécrétion des protéases. Le système de sécrétion de type II, comprend une première étape de translocation à travers la membrane interne via le système Sec puis la deuxième étape de translocation à travers la membrane externe fait intervenir un système auxiliaire composé de 13 à 15 protéines. Les pectate-lyases d'*E. chrysanthemi* sont sécrétées par un système de type II. Enfin, le système de sécrétion de type III est un complexe protéique traversant les deux membranes. Il permet l'exportation directe des protéines de virulence dans les cellules de l'hôte animal ou végétal ; certaines protéines Yop chez *Yersinia* spp. ou certaines protéines Hrp chez *Xanthomonas campestris* empruntent ce système de sécrétion (Rossier et coll., 1999 ; Hueck, 1998).

Dans la plupart des cas, la transduction des signaux s'effectue par un couple capteur-régulateur. Ces systèmes sont très fréquents chez les bactéries, Grebe et Stock (1999) en répertorient plus de 300. Le capteur est une protéine membranaire qui s'autophosphoryle en réponse à un signal spécifique, puis transfère ce groupement phosphoryle au régulateur. Le taux de régulateur phosphorylé détermine alors l'expression des gènes sous son contrôle. Le couple capteur-régulateur le plus étudié est EnvZ-OmpR. EnvZ perçoit l'osmolarité du milieu et régule le taux de OmpR phosphorylé aboutissant à l'expression régulée de façon différentielle des porines OmpC et OmpF (Mizuno et Mizushima, 1990).

I.2 La membrane externe.

La membrane externe est une structure spécifique des bactéries à Gram négatif qui contribue à leur résistance plus marquée que les bactéries à Gram positif vis-à-vis des colorants lipophiles, des détergents et de la plupart des antibiotiques. Cependant, cette barrière permet le libre passage des solutés de petite taille (<650 Da), l'entrée de nutriments et de produits de plus grande taille (Nikaido, H., 1999). La structure de cette membrane détermine sa spécificité.

I.2.1 La bicouche lipidique : LPS et phospholipide.

Les deux feuillettes formant la bicouche lipidique ont une composition totalement différente. Le feuillet interne est formé d'une couche de phospholipides de composition

similaire à la membrane cytoplasmique (PE, PG, CL) avec une proportion en phosphoéthanolamine légèrement plus importante (Osborn et coll., 1972). Le feuillet externe est quant-à lui composé exclusivement de lipopolysaccharides (LPS).

Le LPS est constitué de trois parties (Fig I-2) : une partie hydrophobe, le lipide A, une partie oligosaccharidique centrale et une partie polysaccharidique distale. Le lipide A est formé d'un disaccharide, glucosaminy- β -(1→6)-glucosamine, substitué par six à sept acides gras pour la plupart saturés et hydroxylés. L'oligosaccharide central est composé de glucose, de galactose, de N-acétyl-D-glucosamine et des sucres spécifiques aux LPS : le KDO (acide 3-désoxy-D-mannoctulosonique) et un heptose (L-glycéro-D-mannoheptose). Le polysaccharide distal définit la spécificité antigénique O. Il est constitué de la répétition d'unités tri-, tétra-, ou pentasaccharidiques. Le lipide A et la région centrale comportent de nombreuses charges essentiellement anioniques, apportées par les résidus de phosphoryle et de pyrophosphoryle substituant ces deux parties ou par le KDO, qui participe en association avec les ions divalents à l'intégrité de la membrane externe. Les propriétés du LPS sont responsables de l'exclusion des composés hydrophobes.

1.2.2 Les protéines associées et leurs fonctions.

Les protéines de la membrane externe peuvent être séparées en deux classes : les protéines majeures, qui regroupent un petit nombre de protéines à grand nombre de copies constituant ainsi la majorité des protéines de la membrane externe, et les protéines mineures, qui regroupent une variété plus importante de protéines mais dont le nombre d'exemplaire dans la membrane est faible.

Les protéines majeures incluent la lipoprotéine de Braun, les porines et OmpA. Ces protéines participent au maintien de l'intégrité de l'enveloppe et au transport de petits solutés hydrophiles.

La lipoprotéine de Braun, de petite taille (7200 Da), est présente à $7 \cdot 10^5$ copies par cellule. Le résidu cystéine en position N-terminale est substitué sur le groupement thiol par un diglycéride et par un acide gras sur le groupement amine. Ces chaînes d'acides gras permettent l'ancrage de la lipoprotéine au feuillet interne de la membrane externe (Fig I-1). En position C-terminale, le groupement amine de la chaîne latérale du résidu de lysine est lié de façon covalente dans un tiers des cas au peptidoglycane. La lipoprotéine permet ainsi la fixation de la membrane externe à la paroi sous-jacente. En effet, les mutants délétés du gène codant la lipoprotéine (*lpp*) produisent une membrane externe instable et relargue des

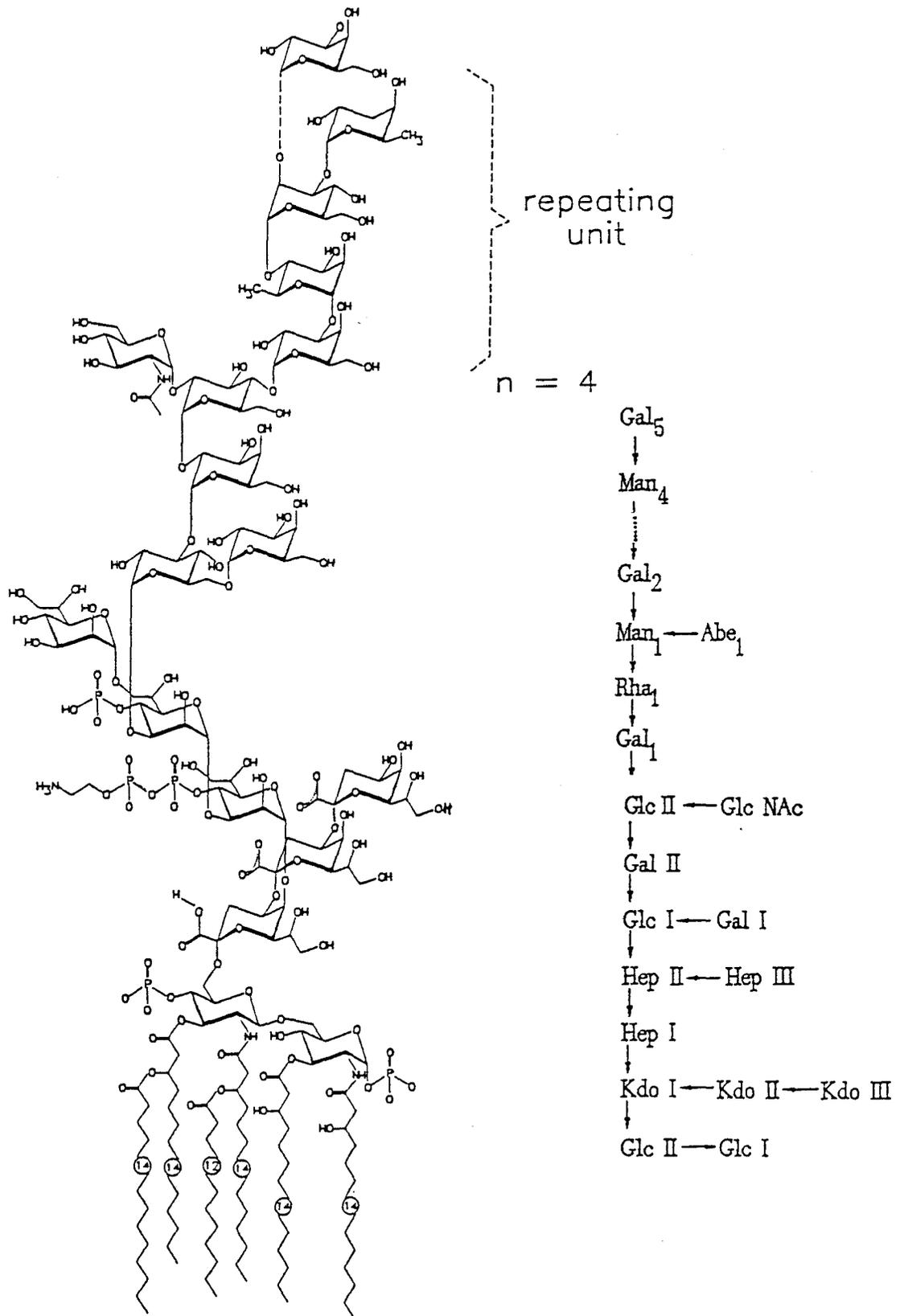


Figure I-2 : Modèle de structure de Lipopolysaccharide (LPS) d'entérobactéries. La chaîne latérale de spécificité O consiste en un grand nombre de répétition d'unités identiques. Le lipide A et le noyau sont assez semblables selon les espèces d'entérobactéries alors que la chaîne latérale est très spécifique de chaque souche (Kastowsky, 1992).

vésicules de membrane externe (OMV) et des enzymes périplasmiques dans le milieu (Hirota et coll., 1977). Les propriétés de perméabilité aux composés hydrophiles ne sont pas modifiées (Nikaido, 1977).

Les porines sont des homotrimères formés d'une des protéines suivantes : OmpC, OmpF ou PhoE. Chaque unité constitue un pore permettant le passage rapide et relativement non-spécifique de petites molécules hydrophiles. La protéine PhoE est produite en conditions de carence en phosphate. La protéine OmpC, dont le pore est légèrement plus petit que celui de la protéine OmpF, est synthétisée préférentiellement à haute osmolarité et à basse température. La quantité totale des porines est relativement constante, mais l'abondance relative des protéines OmpF et OmpC est régulée par de nombreux signaux environnementaux : osmolarité, pH, pression en oxygène, stress oxydatif, concentration périplasmique des OPG... (Pratt et coll., 1996). De plus, les porines interagissent fortement avec la couche de peptidoglycane et participent donc à la fixation de la membrane externe à la paroi.

La protéine OmpA présente un poids moléculaire et une structure en tonneau de feuillet β -antiparallèles équivalents aux porines, mais sa fonction ne semble pas être la même. En effet, *in vitro*, la pénétration des solutés à travers le pore de la protéine OmpA est deux fois moins importante qu'à travers le pore de la protéine OmpF et donc ne participerait pas de manière significative à la perméabilité de la membrane externe (Sugawara et Nikaido, 1992 ; Saints et coll., 1993). Le nombre de protéines OmpA est de 10^5 par cellule et il semble que ces unités soient organisées en homooligomère ou en association stœchiométrique avec d'autres protéines. Les mutants *ompA* tendent à former des cellules dont la membrane externe est instable (Nikaido et Vaara, 1985). La fonction supposée de OmpA serait donc de stabiliser la membrane externe.

Parmi les protéines mineures de la membrane externe sont classés les canaux spécifiques, les récepteurs de haute affinité et certains composants des systèmes d'efflux, AcrAB (Nikaido, 1996) ou d'exportation des protéines (Pugsley, 1993).

Parmi les canaux spécifiques, on peut citer chez *E. coli*, LamB qui permet le passage du maltose et des maltodextrines, Tsx qui facilite la diffusion des nucléosides et ScrY, codé par un plasmide, qui permet le transport du saccharose. Bien que classée parmi les protéines mineures, LamB est soumise à une régulation qui peut la rendre très abondante à la surface de la cellule. L'organisation de LamB dans la membrane externe est très similaire à celle des

porines. La chaîne polypeptidique forme un tonneau en feuillets bêta antiparallèles et les sous-unités LamB s'associent en trimères (Nikaido, 1992).

Les récepteurs de haute affinité catalysent également le transport de ligand spécifique à travers la membrane externe, mais se différencient des canaux spécifiques par deux aspects. Le premier est l'affinité extrêmement élevée, le coefficient de dissociation (K_d) est de l'ordre du μM voire du nM (alors qu'il est de l'ordre du mM pour les canaux). De ce fait, la liaison du ligand est très forte d'où l'appellation de récepteur. La deuxième différence est l'utilisation de la force proton motrice comme source d'énergie via la protéine TonB ancrée dans la membrane cytoplasmique (Postle, 1993). Il est ainsi possible d'accumuler le ligand, dans le périplasma, à des concentrations jusqu'à 1000 fois supérieures à la concentration externe dans le cas par exemple de la vitamine B12 (Bradbeer, 1993).

I.3 Le périplasma.

Le périplasma, délimité par la membrane interne et la membrane externe, est un compartiment cellulaire où se produisent de nombreux processus vitaux pour la croissance ou la viabilité de la cellule. L'architecture du périplasma facilite la croissance de la paroi cellulaire et de la membrane externe et coordonne ces processus avec la division cellulaire. Les protéines résidentes du périplasma accomplissent des fonctions dans la détection et la dégradation de nutriments essentiels et leur transport dans la cellule. Les protéines périplasmiques interviennent également dans la biogenèse des différentes protéines et de leur complexe incorporé dans la membrane externe ou participent à l'élaboration du peptidoglycane et des couches capsulaires. Le contenu périplasmique fournit un microenvironnement de petite et moyenne molécules qui tamponnent la cellule des variations externes. Dans ce but, le périplasma est un élément dynamique, doué de régulation lui permettant de s'adapter aux changements des milieux qui l'entourent (Oliver, 1996).

I.3.1 La structure du périplasma

Les études de microscopie électronique conduisent à une estimation de la largeur du périplasma entre 13 et 25 nm (Dubochet et coll., 1983; Graham et coll., 1991; Hobot et coll., 1984; Leduc et coll., 1989 et 1985). Cette variation peut être liée à l'expansion ou la contraction du périplasma dues au changement osmotique lors de la préparation des échantillons ou peuvent être dues à la souche ou encore aux conditions de culture employées.

A l'intérieur de cet espace, la couche de peptidoglycane (ou muréine), en association étroite avec la membrane externe, occupe une épaisseur de 5 à 8 nm (Dubochet et coll., 1983 ; Graham et coll., 1991 ; Hobot et coll., 1984). Des études microscopiques plus fines montrent que la région interne du périplasma, comprise entre la couche de peptidoglycane et la membrane cytoplasmique, est régulière et riche en matière (Dubochet et coll., 1983 ; Graham et coll., 1991 ; Hobot et coll., 1984). En 1984, Hobot et coll. proposent un modèle pour l'organisation du périplasma dans lequel le peptidoglycane, dans un état de polymérisation variable (plus polymérisé côté membrane externe, moins polymérisé côté membrane interne), est sous la forme d'un gel remplissant l'espace périplasmique. Le réseau muréique fortement hydraté contiendrait une solution aqueuse de protéines, d'oligosaccharides (OPG) et de différentes molécules de petites tailles. Cette vision explique plusieurs données expérimentales dont la faible diffusion des protéines périplasmiques (Brass et coll., 1986).

Les zones d'adhésion entre la membrane externe et la membrane interne ont été mis en évidence chez *E. coli* par microscopie électronique après plasmolyse des cellules (Bayer, 1968 et 1979). Ces zones appelées également jonctions de Bayer ne sont observées que sur des cellules en phase exponentielle de croissance et auraient donc une fonction dans la biogenèse de l'enveloppe. Une hypothèse est que ces zones d'adhésions correspondent au lieu de croissance du peptidoglycane encore lié de manière covalente au bactoprénolpyrophosphate de la membrane interne. De la même manière, ces sites d'adhésion peuvent correspondre à des intermédiaires dans l'exportation du LPS, des phospholipides et des protéines de la membrane externe (Bayer, 1991).

Une controverse est née suite à des analyses utilisant la cryofixation. Celles-ci ne mettaient pas en évidence ces zones de contact entre les membranes et, de ce fait, suggéraient qu'elles résultent d'un artefact post-mortem dû à la fixation chimique (Dubochet et coll., 1983 ; Hobot et coll., 1984 ; Leduc et coll., 1989). Néanmoins, Bayer a contré cette interprétation en mettant en évidence ces jonctions par une méthode moins drastique de cryofixation (Bayer, 1991). Deux types de zones d'adhésion peuvent être observés : les adhésions simples ou isolées, et les adhésions multiples correspondant à l'apposition des membranes, externe et interne.

Les études réalisées par Rothfield et coll. sur les anneaux polaires et périséptaux abondent fortement en faveur de l'existence d'au moins un type de zone d'adhésion (Cook et coll., 1986 ; MacAlister et coll., 1983 ; Rothfield et Cook, 1988). La présence d'une paire d'anneaux concentriques, dans les cellules en division, définit un compartiment dans lequel se

forme le septum. Les cellules filles séparées héritent ainsi d'un anneau qui devient un anneau polaire. Les anneaux polaires et périséptaux divisent ainsi le périplasma en trois types de compartiments qui joueraient un rôle important dans la fonction du périplasma et en particulier dans la division. Cependant les études de Woldringh tendent à expliquer l'existence de ces anneaux par des contraintes physiques. Néanmoins, les travaux récents de Cook et Rothfield tendent à contrecarrer cette hypothèse (Woldringh, C. L., 1994 ; Cook et Rothfield, 1994).

I.3.2 Le saccule de muréine

Le saccule de muréine constitue la paroi bactérienne. Il détermine la forme de la cellule, et dans les milieux de basse osmolarité, assure l'intégrité de la membrane cytoplasmique. La caractérisation structurale de la muréine montre qu'il s'agit d'un peptidoglycane formé de la polymérisation d'unités muropeptidiques. Chez *E. coli*, cette unité est composée de N-acétylglucosamine (GlcNAc), d'acide N-acétylmuramique (MurNAc), de L-Alanine (L-Ala), d'acide D-glutamique (D-Glu), d'acide *meso*-diaminopimélique (DAP), et de D-Alanine (D-Ala). L'association des unités muropeptidiques forme une chaîne glycanique constituée de la répétition en alternance des deux unités saccharidiques : GlcNAc et MurNAc. Les liaisons glycosidiques sont de type β -1,4. Les chaînes peptidiques (L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala) sont fixées par une liaison amide à la fonction acide carboxylique de l'acide N-acétylmuramique (MurNAc). Les enchaînements adjacents d'unités muropeptidiques peuvent être reliés par des liaisons amides entre les chaînes peptidiques. Dans la majorité des cas, cette liaison relie la D-Ala d'un peptide au DAP du peptide de l'enchaînement voisin, dans 20% des cas cette liaison relie deux DAP (Park, 1996). L'interconnexion des chaînes de peptidoglycane forme un réseau et constitue une couche. Chez les autres espèces bactériennes, la structure du peptidoglycane varie au niveau de la composition des peptides, de la nature et du degré de branchement.

La synthèse des unités muropeptidiques s'effectue dans le cytoplasme et en association avec la membrane interne (van Heijenoort, 1996). Les premières étapes conduisent à la synthèse d'un précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide (L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala). La partie phospho-MurNAc-pentapeptide est ensuite transférée sur l'accepteur membranaire undecaprenyl phosphate pour former le lipide I. La seconde unité saccharidique est ajoutée pour former le lipide II, GlcNAc-MurNAc-(pentapeptidyl)-pyrophosphoryl undecaprenol. Le lipide II est transféré du côté périplasmique de la membrane interne. Les unités sont ensuite polymérisées à partir de l'extrémité non réductrice par des réactions de transglycosylation. Les

connections entre chaînes s'effectuent par des réactions de transpeptidylation qui impliquent l'hydrolyse des liaisons DAla-DAla (van Heijenoort, 1996 ; Nanniga, 1998).

Le saccule muréique est constitué d'une molécule de peptidoglycane, formant un feuillet composé de une à trois couches et dont les chaînes glycaniques sont orientées de façon perpendiculaire à l'axe longitudinal de la cellule (Park, 1996). L'architecture au pôle n'est pas connue, mais on peut imaginer qu'à ce niveau les anneaux de peptidoglycane juxtaposés ont un diamètre de plus en plus réduit. Au cours de la croissance et des divisions, les changements de forme (élongation et septation) impliquent un processus dynamique d'hydrolyse de liaisons et d'insertion de matériel dans la molécule de muréine, tout en maintenant sa cohésion. La compréhension des mécanismes biochimiques pouvant expliquer ce processus, a progressé par la mise en évidence de la spécificité des enzymes impliquées (van Heijenoort, 1996).

I.3.3 La physiologie du périplasma

Les méthodes physiologiques utilisant la répartition de composés radioactifs dont l'accessibilité aux différents compartiments cellulaires diffère aboutissent à un volume périplasmique représentant 20 à 40% du volume cellulaire (Stock et coll., 1977). Cette valeur est surprenante puisqu'il en découle une épaisseur calculée du périplasma de 32 nm (van Wielink et Duine, 1990). Or, aucune méthode microscopique ne montre un tel résultat. Les données de microscopie électronique conduisent à un volume périplasmique de 8 à 16% du volume cellulaire (Graham et coll., 1991). La détermination du volume périplasmique est très importante. En effet, si l'on considère que le volume périplasmique représente 10% du volume cellulaire, alors, le périplasma est rempli de protéines, avec peu d'eau libre et rend ce milieu très visqueux (van Wielink et Duine, 1990). De ce fait, les protéines sont peu mobiles et créent des microenvironnements. Les propriétés cinétiques des enzymes périplasmiques s'en trouvent alors modifiées (Oliver, 1996).

Comme les cellules de plantes, les cellules bactériennes maintiennent une pression osmotique supérieure à celle du milieu extérieur. Cette différence est appelée pression de turgescence. *E. coli* supporte une large gamme d'osmolarité pour sa croissance, ce qui implique une régulation rigoureuse. La structure principale supportant ce stress est le peptidoglycane (ou saccule de muréine). La membrane interne ne supporte pas de contraintes mécaniques (Stock et coll., 1977). Le périplasma et le cytoplasme seraient donc iso-osmotiques. Cependant, compte tenu de l'état visqueux, de type gel, suggéré pour le périplasma, celui-ci peut exercer une force mécanique sur la membrane interne en condition

hypo-osmotique. Cet aspect expliquerait pourquoi le volume périplasmique est maintenu même lorsque les OPG, osmoprotectants supposés, sont absents (Oliver, 1996).

L'aptitude des cellules d'*E. coli* à croître dans une large gamme d'osmolarité sans changement important du volume périplasmique suggère des mécanismes qui équilibrent l'osmolarité de ces deux compartiments. A haute osmolarité, la cellule est confrontée à une perte d'eau et à l'abolition de la pression de turgescence. Dans ce cas, la réponse est, dans un premier temps, l'importation d'ions potassium afin d'augmenter l'osmolarité du cytoplasme, puis ceux-ci sont remplacés par l'accumulation de solutés compatibles tel que la glycine-bétaïne, la proline et le tréhalose (Csonka et Epstein, 1996 ; Ingraham et Marr, 1996). Lors du passage à basse osmolarité, le volume du périplasma aurait tendance à diminuer, sauf si celui-ci est incompressible ou si des solutés non diffusibles à travers la membrane tels que les OPG sont synthétisés dans le périplasma (Oliver, 1996). Le rôle des OPG dans l'osmoprotection sera discuté dans le paragraphe III.5.1.

I.3.4 Les protéines périplasmiques et leurs fonctions.

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

Les protéines affines permettent la détection ou le transport de sucres, acides aminés, peptides, vitamines et ions en association avec des transporteurs de type ABC et/ou des récepteurs du chimiotactisme.

Les enzymes cataboliques hydrolysent les molécules complexes en précurseurs utilisables par la cellule (phosphatases, protéases, nucléases).

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

Les protéines qui interviennent dans la biogenèse de l'enveloppe et de ses structures annexes participent à la mise en conformation des protéines (DsbA et DsbC : formation des ponts disulfures ; RotA, FkpA, SurA: isomérisation des résidus de proline; PapD, p20, protéines chaperons respectivement des pilis ou de la lipoprotéine) ou interviennent dans les processus de biosynthèse et/ou d'exportation des exopolysaccharides, des protéines sécrétées, du peptidoglycane, du LPS et des OPG.

Le système Tol comprend deux protéines périplasmiques (TolB et Orf2), trois protéines membranaires (TolA, TolQ et TolR) et une lipoprotéine de la membrane externe

Pal. Les protéines TolA, TolQ et TolR forment un complexe qui présente des similitudes avec le complexe TonB-ExbB-ExbD impliqué dans l'entrée des complexes fer-sidérophore et de la vitamine B12. La lipoprotéine Pal peut interagir avec le peptidoglycane et la protéine TolB. Les complexes TolA-TolQ-TolR et Pal-TolB pourraient interagir au moins transitoirement (Ladzunski, 1998; Lazzaroni et coll., 1999). Ce complexe serait localisé principalement aux sites d'adhésion entre les membranes externe et interne (Guihard et coll., 1993). Mais, l'existence de ces sites est encore soumis à caution (Cook et Rothfield, 1994; Woldringh, 1994). Les mutants du système *tolQRAB* sont hypersensibles aux sels biliaires, relâchent des protéines périplasmiques dans le milieu et produisent des vésicules de membrane externe (Webster, 1991; Bernadac et coll., 1998). Les phénotypes de ces mutants montrent le rôle important du système Tol dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe. L'entrée des colicines A et des phages filamenteux dépend du système Tol (Ladzunski, 1998; Click et Webster, 1998). Son implication probable dans la translocation des trimères de porine et/ou du LPS permet d'avancer l'hypothèse que le système Tol permet le passage de composants de la membrane externe nécessitant l'utilisation d'une source d'énergie (Lazzaroni, 1999).

I.4 Les couches et structures associées à l'enveloppe

I.4.1 Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire sécrétés par une grande variété de bactéries. Ils peuvent être associés à la paroi cellulaire et former la capsule ou être libérés dans le milieu sous la forme d'un mucus extracellulaire (Sutherland, 1988). Leur synthèse implique soit un seul type de monosaccharide, ils sont alors des homopolysaccharides ou plusieurs monosaccharides qui forment une unité de répétition, ce sont alors des hétéropolysaccharides.

Chez *E. coli*, la capsule détermine l'antigénicité de type K. Sur les différentes souches d'*E. coli*, 80 antigènes ont été répertoriés. Ces capsules ont été séparées en quatre groupes sur la base de la composition chimique, de la masse moléculaire, des relations intergéniques et de leur expression (Clarke et coll., 1999 ; Pearce et Roberts, 1995 ; Whitfield et Roberts, 1999). Les EPS du groupe I sont caractérisés par une masse moléculaire élevée ($M > 100$ kDa) et une faible densité de charge, ils peuvent être associés à la région centrale des LPS (MacLachlan et Coll, 1993 ; Whitfield et Valvano, 1993). Les EPS du groupe II sont labiles à la chaleur, leur masse moléculaire est plus faible ($M = 50$ kDa) et présentent une forte densité de charge (Jann et Jann, 1990). L'extrémité réductrice des EPS du groupe II est liée au phosphatidylglycérol et

et Jann, 1990). L'extrémité réductrice des EPS du groupe II est liée au phosphatidylglycérol et permettrait l'ancrage à la surface cellulaire (Jann et Jann, 1990; Schmidt et Jann, 1982). Les gènes impliqués dans la synthèse des EPS des groupes I, II, III et IV ne sont pas alléliques. La synthèse des exopolysaccharides passe par la synthèse du côté cytoplasmique de la membrane d'unité saccharidique lié au pyrophosphoryl undecaprénol. Ces unités sont transférées dans le périplasme et polymérisées selon des mécanismes qui diffèrent en fonction du groupe d'EPS (Whitfield et Roberts, 1999).

L'acide colanique (également dénommé antigène M), EPS du groupe I, est produit en faible quantité par la plupart des souches mais sa synthèse est fortement augmentée dans des conditions spécifiques de croissance : basse température de croissance ($< 30^{\circ}\text{C}$), haute osmolarité, concentration élevée en phosphate (Gottesman et Stout, 1991; Sledjeski et Gottesman, 1996). La forte mucosité engendrée par l'augmentation de la synthèse de l'acide colanique est également observée en présence de certaines mutations affectant notamment l'intégrité de l'enveloppe (Parker et coll., 1992; Missiakas et coll., 1996; Ebel et coll., 1997; Kelley et Georgopoulos, 1997). La régulation des gènes *cps*, qui gouvernent la polymérisation, le transport et la modification du polysaccharide (Stevenson et coll., 1996), est effectuée d'une part par le couple capteur-régulateur, RcsC/RcsB (Stout et Gottesman, 1990), et d'autre part par 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.

Parmi les EPS du groupe II, on peut citer l'antigène K1 qui résulte de la polymérisation en α -2,8 de l'acide sialique et qui est retrouvé chez les souches responsables de 80% des cas de méningite néonatale et dans la plupart des cas de septicémie néonatale (Bliss et Silver, 1996).

I.4.2 La couche-S

Une variation possible de la surface cellulaire provient de la présence, à la périphérie la plus externe, d'une couche-S (Sára et Sleytr, 2000). Cette structure est présente chez des bactéries à Gram positif et négatif (mais également chez les archées). Elle consiste en une couche cristalline et monomoléculaire de sous-unités protéiques ou glycoprotéiques organisées de façon cristalline selon un système géométrique carré, hexagonal ou oblique

(Beveridge et Graham, 1991). Les sous-unités, protéique ou glycoprotéique, sont douées d'une capacité d'auto-assemblage sous une forme similaire à celle présente à la surface des cellules et souvent composées d'un seul type d'unité. Chez les bactéries à Gram positif, les sous-unités des couches-S peuvent être des glycoconjugués, c'est à dire liées de manière covalente à un oligosaccharide (Sára et Sleytr, 2000). Chez les bactéries à Gram négatif, une sous-unité glycoprotéique n'est décrite que chez *Aquaspirillum simuosum* (Smith et Murray, 1990).

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

I.4.3 Les flagelles

La plupart des bactéries motiles se déplacent grâce à des flagelles. Chez *E. coli*, les flagelles, répartis sur toute la cellule, sont dits péritriches. Chaque flagelle est formé de trois parties. Le filament est relié au crochet, lui-même fixé au corps basal ancré dans l'enveloppe. Le corps basal est une structure complexe qui contient l'unité motrice. L'énergie permettant la rotation du flagelle provient de la conversion de la force proton-motrice à travers la membrane interne. La rotation des flagelles dans un sens ou dans l'autre permet la motilité ou la culbute de la cellule. La nage est ainsi orientée par une alternance de période de motilité et de culbute dont la durée et la fréquence sont déterminées par le chimiotactisme. Les acteurs du chimiotactisme sont des protéines membranaires qui perçoivent le gradient de certains composés. Par exemple, l'aspartate et le maltose sont perçus par la protéine Tar, la sérine par Tsr, le ribose, le galactose et le glucose par Trg (Stock et Surette, 1996 ; Manson et coll., 1998). La sensibilité et la réponse des récepteurs sont déterminées par leur taux de méthylation. Les informations sont ensuite intégrées par une cascade de phosphorylation/déphosphorylation par les protéines Che qui gouvernent la rotation des flagelles.

I.4.4 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. Dans la conjugaison, les pilis sexuels permettent l'attachement initial entre les partenaires. D'autres pilis sont impliqués dans l'attachement des bactéries aux cellules eucaryotes. Les adhésines sont les protéines responsables de l'attachement et se situent à la pointe du pili.

II GLYCOBIOLOGIE DES INTERACTIONS BACTERIE-ENVIRONNEMENT

Les bactéries à Gram négatif peuvent être confrontées à différents environnements selon leur mode de vie : l'état planctonique ou l'association en biofilm, l'interaction symbiotique, commensale ou parasitaire avec les plantes ou les animaux. Dans ces différents modes de vie, les composés glucidiques et glycoconjugués peuvent jouer des rôles très variés, plus ou moins difficiles à mettre en évidence et à expliquer au niveau moléculaire. Les fonctions attribuées peuvent être : la signalisation, le maintien de l'intégrité de la cellule, la protection... Parmi les glycoconjugués, le peptidoglycane joue un rôle essentiel dans la résistance à l'environnement. Les espèces dépourvues de peptidoglycane, mollicutes et mycoplasmes, sont des parasites obligatoires fortement dépendants de l'environnement. Les paragraphes suivants relatent quelques exemples de rôles attribués aux glycanes et glycoconjugués associés à l'enveloppe ou sécrétés dans le milieu pour ces différents modes de vie.

II.1 Les exopolysaccharides.

II.1.1 Rôle de la capsule dans l'écosystème extérieur.

Plusieurs expériences tendent à montrer l'implication des exopolysaccharides dans la prévention de la dessiccation et dans la formation de communautés bactériennes en biofilm (Costerton et coll., 1987). Lopez et coll. (1999) ont étudié la capacité de survie de mutants de *X. campestris* pv. *campestris* dans l'écosystème sol. Leurs résultats montrent que dans un sol non stérile, comportant une communauté naturelle de bactéries, les mutants ne produisant plus d'EPS ou de protéases sont affectés, alors que dans un environnement stérile, seuls les mutants ne produisant plus d'EPS sont défavorisés, illustrant ainsi le rôle des EPS dans la prévention de la dessiccation.

L'étude des biofilms suscite actuellement un grand intérêt, mais leur description est ancienne (ZoBell, 1943). La vision des bactéries largement répandue considère ces organismes comme unicellulaires et primitifs, qui luttent pour leur propre survie. Il apparaît plus clairement actuellement que les bactéries peuvent également se comporter comme un véritable tissu procaryote avec son architecture et ses communications intercellulaires (Kolter et Losik, 1998 ; Costerton et coll., 1994 ; Bull. Soc. Fr. Microbiol., vol. 14 n°1,2,4, 1999).

L'association en biofilm confère aux bactéries une résistance aux agents délétères (dessiccation, antibiotiques, détergents...) et leur offre des opportunités métaboliques nouvelles grâce à l'interaction avec d'autres espèces et à la concentration de divers composés. Après une première adhésion, la cellule s'engage vers un nouvel état physiologique. L'activation de la synthèse des EPS renforce la fixation au support et participe à l'édification de la matrice du biofilm (Cooksey, 1992 ; Davies et Coll, 1993). L'hydratation des EPS conduit à la formation d'une couche muqueuse qui contient jusqu'à 99% d'eau (Carpentier, 1999). Les supports sur lesquels se forment les biofilms peuvent être des tissus vivants ou des matériaux abiotiques (Prigent-Combaret et Lejeune, 1999). Ainsi, le mode de vie en biofilm s'applique à plusieurs niches écologiques telles que le sol, l'hôte animal ou végétal (exemples : rhizosphère, plaque dentaire, ...). Les rôles attribués aux EPS dans la physiologie du biofilm s'appliquent donc aux interactions avec l'hôte animal ou végétal dans les processus symbiotiques, commensaux et pathogènes.

II.1.2 Rôle de la capsule dans les interactions avec l'animal

La capsule permet d'éviter les défenses de l'hôte par un processus mécanique qui empêche la phagocytose ou par un processus mimétique dans le cas, par exemple, de l'antigène K1, qui est un polymère d'acide sialique (PSA) (Costerton et coll., 1987).

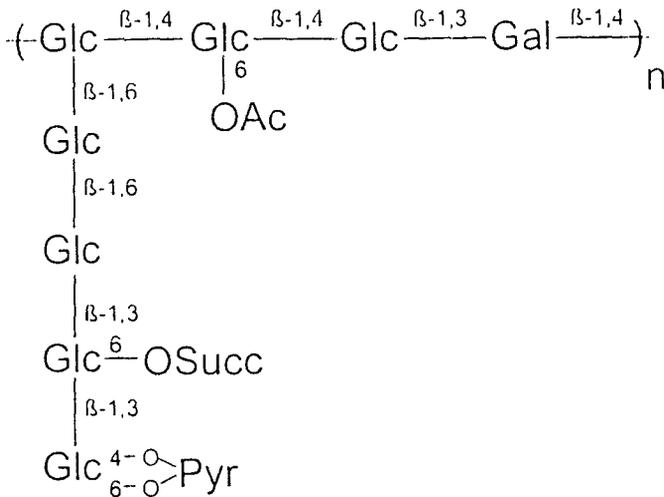
Chez *E. coli* et d'autres entérobactéries pathogènes, l'expression de la capsule doit s'adapter à différents modes de vie : l'état libre ou associé à l'hôte. Selon les conditions, la synthèse de la capsule est régulée négativement dans le tube digestif ou positivement dans le sang. La régulation de la capsule fait intervenir des protéines de type histone et des systèmes capteurs-régulateurs (H-NS, IHF, *rca*, *rfaH*...) (Rick et Silver, 1996 ; Melakanos, 1991).

II.1.3 Rôle de la capsule dans les interactions avec la plante

Les polysaccharides de surface ne représentent pas qu'un manteau passif de protection, ils servent également de signaux de reconnaissance vis-à-vis de la plante (Long et Stakawicz, 1993).

Les exopolysaccharides produits par *Sinorhizobium meliloti* sont nécessaires à l'établissement de la relation symbiotique. Deux types d'exopolysaccharides acides peuvent être synthétisés, le succinoglycane (EPS I) et le galactoglucane (EPS II) (Fig I-3). La synthèse d'au moins un de ces EPS est nécessaire à l'invasion des nodosités formées sur la plante hôte, *Medicago sativa* (Glazebrook et Walker, 1989 ; Becker et coll., 1997). Les gènes impliqués dans la synthèse des EPS sont organisés en deux locus distincts sur le mégaplasmide 2 (ou

Succinoglycan



EPS II

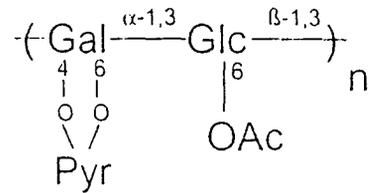


Figure I-3 : représentation schématique de l'unité de répétition du succinoglycane et de l'exopolysaccharide II produits par *S. meliloti*. Glc, glucose, Gal, galactose, O-Ac, résidu d'acétyle, O-Succ, résidu de succinyle, Pyr, résidu de pyruvyl (Leigh et Walker, 1994).

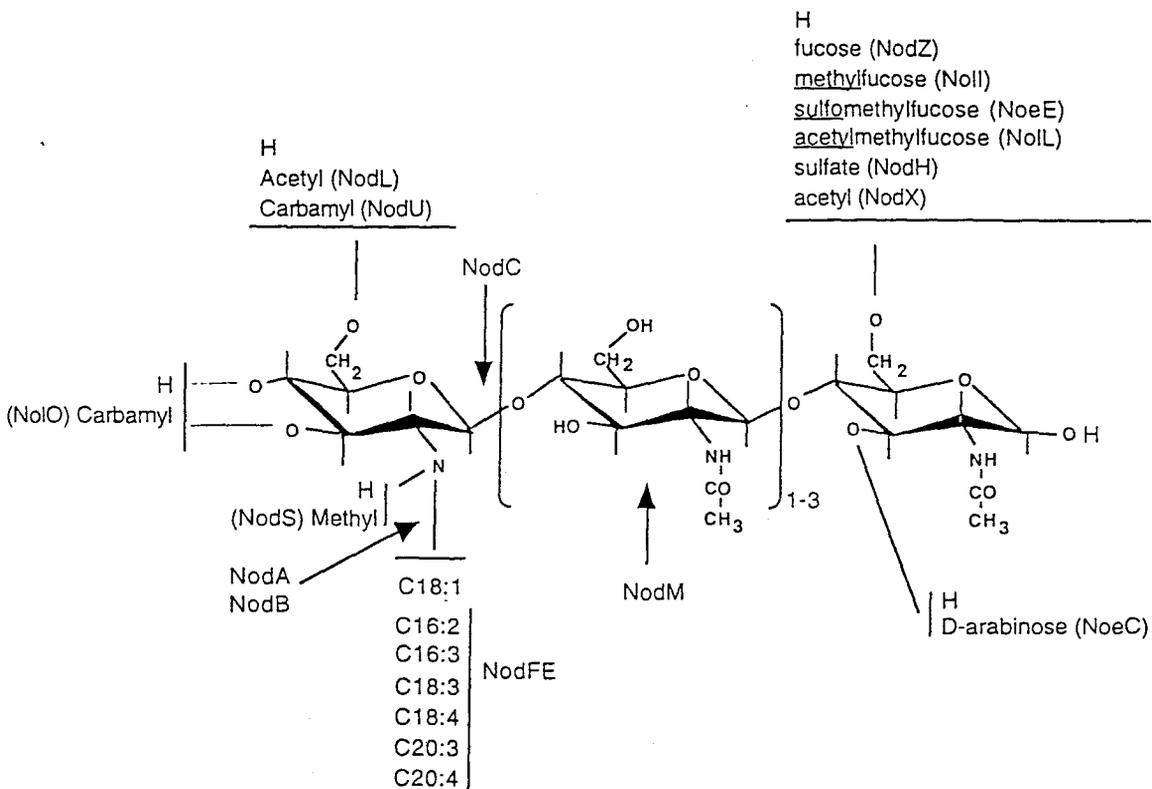


Figure I-4 : Structure générale des facteurs Nod et rôle proposé des différents produits des gènes *nod* dans leur biosynthèse (Boivin et Dénarié, 1998).

pSymb, 1,5Mb). Il s'agit des gènes *exp* pour la synthèse du galactoglucane (Becker et coll., 1997) et des gènes *exo* pour la synthèse du succinoglycane (Glucksmann et coll., 1993). Le succinoglycane dont la fonction dans l'établissement de la symbiose est la plus clairement définie, est un polymère d'unité octasaccharidique, composé de sept résidus de glucose et d'un résidu de galactose, substitué par des résidus de succinyle, d'acétyle et de pyruvyle (Reinhold et coll., 1994). La synthèse de l'unité de répétition octasaccharidique s'effectue sur un composé lipidique (pyrophosphoryle isoprénol) ancré dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique et implique plusieurs enzymes qui transfèrent les unités saccharidiques à partir de nucléotides-sucres. La polymérisation des unités octasaccharidiques s'effectue dans le périplasme et nécessite la translocation des précurseurs liés au pyrophosphoryle isoprénol (Leigh et Walker, 1994). Trois protéines sont impliquées dans la substitution : ExoH qui transfère du succinyle à partir du succinyl-CoA, ExoZ qui transfère de l'acétyle à partir de l'acétyl-CoA et ExoV qui transfère du pyruvyle à partir du phospho-énolpyruvate. ExoH et ExoZ sont des protéines intégrées à la membrane, ExoV est cytoplasmique et nécessaire à la polymérisation du succinoglycane (Glucksmann et coll., 1993). Les surnageants de culture de *S. meliloti* contiennent deux classes de succinoglycane de taille différente : les polymères de faible poids moléculaire (LMW) et les polymères de haut poids moléculaire (HMW). Les endo-1,3-1,4- β -glycanases, ExoK et ExsH, dépolymérisent les chaînes naissantes HMW pour donner la fraction LMW des succinoglycane. Les molécules de faible poids moléculaire (LMW), formées de quatre unités de répétition, peuvent partiellement restaurer le défaut d'invasion des nodosités des mutants *exo*, et seraient donc des signaux nécessaires à cette étape du processus symbiotique (Battisti et coll., 1981). Les modifications du succinoglycane par les résidus d'acétyle et de succinyle influencent sa susceptibilité aux clivages par ExoK et ExsH. Les mutants *exoH* qui produisent des succinoglycane HMW non succinylés, ne sont pas capables d'envahir les nodosités (Leigh et coll., 1987). Les mutants *exoZ*, qui produisent une plus grande proportion de succinoglycane LMW dépourvus d'acétyle, restent capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Reuber et Walker, 1993). Cheng et Walker (1998) ont déterminé pour chaque mutant *exo* le stade auquel le processus symbiotique était arrêté. Ils suggèrent ainsi que les succinoglycane sont nécessaires à l'initiation et à l'élongation du cordon d'infection lors de la colonisation des nodosités.

Les EPS peuvent être également impliqués dans le pouvoir pathogène. Tous les pathovars de *X. campestris* synthétisent des EPS, connus sous le nom de xanthanes. Leur structure consiste en un squelette cellulosique (-Glc*- β -1,4-Glc-)n sur lequel est fixée une

chaîne trisaccharidique (Man- β -1,4-GlcA- β -1,2-Man- α -1,3-). Les résidus de mannose sont acétylés et pyruvylés à différents degrés. Chez *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, les mutants déficients dans la synthèse des EPS ont une virulence réduite vis-à-vis de la plante (Katzen et coll., 1998). Les EPS et les exoenzymes, qui participent à la pathogenèse, sont co-régulés par un système à deux composants qui perçoit un facteur intercellulaire diffusible (DSF). L'inactivation de ce système réduit fortement les symptômes (Slater, 2000). Les exopolysaccharides obstruent les vaisseaux et participent à l'apparition du premier symptôme de la maladie : le noircissement des veines. Les EPS permettraient de réduire le contact avec les molécules toxiques de défense de la plante et de concentrer les minéraux et nutriments (Denny, 1995).

II.2 La couche-S et les glycoprotéines sécrétées ou associées à l'enveloppe.

La démonstration de la présence des glycoprotéines chez les procaryotes est récente. Les premières glycoprotéines décrites sont les sous-unités formant la couche-S de certaines espèces d'archées. Actuellement, la présence d'une glycosylation sur les protéines de la couche-S est également montrée chez plusieurs bactéries à Gram positif, et une bactérie à Gram négatif *Aquaspirillum sinuosum* (Messner, 1997). Dans plusieurs investigations, la mise en évidence de protéines glycosylées repose exclusivement sur une coloration positive à une réaction spécifique des sucres. Or, il est difficile, en particulier dans le cas des bactéries à Gram négatif, d'exclure une contamination par du lipopolysaccharide (Messner, 1997).

Les exemples de glycoprotéines chez les bactéries à Gram négatif sont assez restreints (Messner, 1997). Chez *Myxococcus xanthus*, protéobactérie de la subdivision ϵ/δ particulièrement étudiée pour sa capacité à former des organes de fructification, une glycoprotéine de 74000 Da de la membrane externe appelée VGP a été mise en évidence sur les cellules végétatives (Maeba, 1986). Chez *Clostridium thermocellum* et *Bacteroides cellulosolvens*, certaines sous-unités du complexe multiprotéique dégradant la cellulose sont des glycoprotéines particulièrement étudiées. La liaison entre les chaînes glycaniques et les protéines implique un résidu de galactose et des résidus de thréonine ou de sérine (Gerwig et coll., 1992 et 1993). Chez *Borrelia burgdorferi*, agent causal de la maladie de Lyme, une protéine de la membrane externe posséderait un glycane lié via un résidu de chitobiose par

une liaison N-glycosidique à une asparagine (Sambri et coll., 1992). Chez *Azospirillum brasilense* (Moens et coll., 1995) et *Campylobacter coli* (Guerry et coll., 1996 ; Doig et coll., 1996), les flagellines sont glycosylées et l'identification de mutants ou le clonage de gènes impliqués dans cette modification post-traductionnelle présentent un grand intérêt. Chez *Neisseria meningitidis*, la glycosylation de la piline Pile est démontrée sans ambiguïté. Le glycane est un trisaccharide, contenant un di-galactose terminal lié en β -1,4 à un 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose, relié par une serine ou une thréonine à la chaîne polypeptidique (Stimson et coll., 1995). Parmi les glycoprotéines sécrétées, on peut citer les exoenzymes produits par *Flavobacterium meningosepticum* : les endo- β -N-acétyl-glycosaminidases F2 et F3 et la protéase P40. Dans ce cas, le glycane est un heptasaccharide acide O-lié à une sérine ou une thréonine inclus dans les consensus suivants : Asp-Ser* ou Asp-Thr*-Thr (Plummer et coll., 1995 ; Reinhold et coll., 1995). Des glycoprotéines cytoplasmiques seraient également mises en évidence chez les bactéries, mais leur localisation ne semble pas clairement établie (Messner, 1997). Actuellement, aucune information concernant la fonction biologique de la partie glycanique des glycoprotéines n'est disponible. Par analogie avec les fonctions attribuées aux glycoprotéines eucaryotes, il peut être proposé que la partie glycanique protège ou module les propriétés physicochimiques ou biologiques de la protéine native, ou encore sert de déterminant dans les processus de reconnaissances moléculaires (Lis et Sharon, 1993 ; Montreuil, 1995 ; Messner, 1997).

II.3 Le LPS : lipopolysaccharide

II.3.1 Fonction du LPS

La perte de la région centrale du LPS, dans le cas des mutants "deep rough", rend les souches extrêmement sensibles aux composés hydrophobes tels que des colorants, des antibiotiques, des agents mutagènes, les sels biliaires ou des détergents. Cette partie est donc impliquée dans le maintien des propriétés de barrière de la membrane externe. Les mutants dans le lipide A sont conditionnels. Ce composé est probablement indispensable à l'assemblage de la membrane externe (Nikaido, 1996).

II.3.2 Rôle du LPS dans les interactions avec l'animal

La présence de LPS induit la transduction de signaux dans les cellules animales. Par exemple, la reconnaissance du LPS par les macrophages peut être directe ou faire intervenir le

récepteur CD14 et un complexe LPS-LBP (LPS Binding Protein). Cette perception conduit à l'expression de cytokines, de NO-synthase et de facteurs activateurs des plaquettes. Ce processus inflammatoire participe au choc septique induit par l'endotoxine (LPS) dans les infections sévères (Raezt, 1996). Un lipide A de synthèse mime, assez étroitement, l'effet induit par le LPS (Galanos et coll., 1985; Levin et coll., 1993). Le lipide A de *R. sphaeroides* quant à lui est un antagoniste de l'endotoxine d'*E. coli* chez l'homme et les cellules de souris (Golenbock et coll., 1991).

Russo et coll. (2000) ont démontré récemment dans un modèle de pneumonie induite par *E. coli* chez le rat, que les polysaccharides de surface modulent la migration des neutrophiles vers l'appareil pulmonaire. Ils suggèrent que la capsule K54 est un médiateur pro-inflammatoire et que l'antigène O4 atténue cette réponse.

D'une façon générale, la perte de l'antigène O conduit à la perte de virulence et suggère que cette portion est importante dans l'échappement à la phagocytose (Nikaido, 1996).

II.3.3 Rôle du LPS dans les interactions avec la plante

Le LPS intervient dans les interactions symbiotiques et pathogènes. Chez *R. leguminosarum*, par exemple, deux formes de LPS sont mises en évidence, une forme légère (I) (lipide A + oligosaccharide central) et une forme lourde (II) (LPS portant un antigène O). Les mutants qui ne possèdent plus d'antigène O sur leur LPS forment un cordon d'infection et induisent la nodulation mais les nodosités restent vides de bactéroïdes (De Maagd et coll., 1989). Chez *X. campestris* pv. *campestris*, Newman et coll. (1994) ont montré qu'un mutant synthétisant un LPS dépourvu d'antigène O a une croissance lente dans les tissus des plantes et ils suggèrent que cette partie polysaccharidique distale du LPS masque la présence des bactéries dans les espaces intercellulaires.

II.4 Les facteurs Nod

Les rhizobiums regroupent des espèces bactériennes appartenant à cinq genres (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) capables d'établir une relation symbiotique avec les plantes de la famille des légumineuses. Cette interaction conduit à la formation, chez la plante, d'organes spécifiques, les nodosités qui procurent aux bactéries un environnement favorable leur permettant de se multiplier et de

réduire l'azote moléculaire en ammoniacque assimilable par la plante. La relation rhizobium-légumineuses est spécifique. Chaque souche interagit avec un ensemble limité de plantes (Boivin et coll, 1997 ; Freiberg et coll., 1997). L'établissement d'une symbiose résulte d'un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. La protéine bactérienne NdoD est un facteur de transcription de type LysR qui perçoit un certain spectre de composés, généralement phénoliques, spécifiquement sécrétés par la plante hôte. La reconnaissance de ces signaux active alors l'expression des gènes *nod* qui contrôlent la synthèse et le transport des facteurs Nod (Lerouge et coll., 1990 ; Fellay et coll., 1998). L'activité biologique des facteurs Nod est très importante puisque leur seule présence, à une concentration de l'ordre du pico- ou du nanomolaire, provoque la déformation de poils absorbants, la division cellulaire et la formation d'un primordium nodulaire (Truchet et coll., 1991 ; Schultze et Kondorosi, 1996). La nature du récepteur des facteurs Nod n'est pas déterminée et plusieurs hypothèses sont formulées (Stougaard, 2000). L'ensemble des signaux envoyés par le partenaire bactérien provoque le déclenchement d'un programme d'organogenèse chez la plante (Dénarié et coll., 1996 ; Schultze et Kondorosi, 1996 ; Stougaard, 2000).

Malgré la grande diversité taxonomique des rhizobiums, les facteurs Nod isolés des diverses espèces bactériennes appartiennent à la même famille chimique : ce sont des lipochitooligosaccharides (Fig I-4 , Boivin et Denarié, 1998). Le squelette de base est constitué de 3 à 5 résidus de glucosamine. Les fonctions amines des sucres sont N-acétylées à l'exception du résidu terminal de l'extrémité non réductrice qui est acylé. La synthèse de ce squelette est sous la responsabilité des gènes *nodABC* présents chez tous les rhizobiums. NodC synthétise et détermine la taille de l'oligomère de chitine. NodA transfère l'acide gras sur la glucosamine désacétylée par NodB. Le nombre des résidus de glucosamine et la nature de l'acide gras pouvant varier, les gènes communs *nodABC* autorisent une certaine variabilité structurale du squelette de base (Boivin et Dénarié, 1998). Le résidu d'acide gras greffé est un acide gras polyinsaturé synthétisé sous le contrôle des gènes *nodFE* ou provient du métabolisme des phospholipides. La présence possible de divers substituants sur les deux résidus de glucosamine terminaux du squelette augmente la diversité structurale des facteurs Nod. Les gènes impliqués dans ce processus codent des enzymes permettant soit la synthèse des formes activées soit le transfert des substituants. L'analyse génétique de la biosynthèse des facteurs Nod a conduit au clonage d'un grand nombre de transférases tel que les acétyltransférases NodL NodL et NodX ou les méthyltransférases NoeI et NodS (Dénarié, 1996 ; Freiberg et coll, 1997 ; Boivin et Dénarié, 1998 ; Jabbouri et coll., 1998 ; Berk et coll., 1999).

Les études réalisées sur des mutants de *S. meliloti* ou de *R. leguminosarum* ont clairement démontré que les facteurs Nod et leurs substitutions spécifiques jouent un rôle déterminant dans la spécificité d'hôte (Roche et coll., 1991 et 1996 ; Spaink et coll., 1991 ; Jabbouri, 1995). De plus, on observe que des espèces phylogénétiquement éloignées, ayant la même plante hôte, produisent des facteurs similaires ou identiques (Dénarié et coll., 1996 ; Mergaert et coll., 1997 ; Lorquin et coll., 1997)

II.5 Les OPG : glucanes périplasmiques osmorégulés.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés sont des composés glucidiques présents dans le compartiment périplasmique de toutes les bactéries à Gram négatif. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe qui reste à définir et sont donc de ce fait des composés essentiels dans l'interaction avec l'environnement.

II.6 But de ce travail

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la glycobiochimie structurale et fonctionnelle. Il se concentre sur l'étude de la biosynthèse et de la fonction des OPG. Il s'articule autour de deux questions : I/ Quelle est la nature des mécanismes impliqués dans la synthèse des OPG de la famille IV ? II/ Quel est le rôle joué par les OPG dans les interactions des bactéries avec l'environnement ?

Le chapitre suivant développe leurs caractéristiques structurales, leurs biosynthèses, leurs régulations et les données précisant leurs rôles.

III LES GLUCANES PERIPLASMIQUES OSMOREGULES

La première mise en évidence des OPG, en 1942, montre la présence de glucanes cyclique β -1,2 dans le milieu de culture de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Ils sont alors considérés comme une sous fraction des exopolysaccharides (McIntire et coll., 1942). La seconde, en 1973, émane de l'étude du renouvellement des phospholipides et montre que le phosphoglycérol est transféré sur une nouvelle classe d'oligosaccharides, appelé Membrane Derived Oligosaccharides (MDO) (van Golde et coll., 1973; Kennedy, 1996). Finalement, le rapprochement de ces molécules est réalisé en 1986 (Miller et coll., 1986).

Les OPG ont été mis en évidence chez toutes les Protéobactéries testées. Leur structure varie en fonction de l'espèce qui les produit, mais les points suivants restent

communs : i) le nombre d'unité saccharidique est faible (5 à 24); ii) le seul constituant saccharidique est le D-glucose; iii) les liaisons glucosidiques sont essentiellement de type β ; iv) la concentration du glucane dans le périplasme augmente lorsque l'osmolarité du milieu diminue (Bohin, 2000).

III.1 Les structures des OPG

La quantité cellulaire d'OPG représente 0,5 à 20% du poids sec des bactéries et varie en fonction de l'espèce considérée, des conditions de culture et de l'état physiologique des cellules. La structure des OPG dépend de l'espèce qui les produit. Cette variation se manifeste au niveau du squelette glucanique (degré de polymérisation, types de liaison glucosidique, polymère branché ou non, linéaire ou cyclique) et en fonction de l'absence ou de la présence de divers substituants. Les variations structurales s'expriment également au sein d'une même espèce et d'une même souche. En effet, les OPG n'ont pas une structure définie et stricte, mais sont constitués d'un ensemble de molécules dont la structure varie autour d'un certains nombres de paramètres tels que : la taille, la position des branches, le taux et le type de substitutions.

III.1.1 Les quatre familles structurales

La structure des OPG a été déterminée pour des espèces appartenant aux subdivisions alpha, bêta et gamma des Protéobactéries. Sur la base du squelette glucanique, quatre familles peuvent être distinguées (Fig I-5) :

La Famille I : Les OPG de la famille I sont hétérogènes en taille. Chez *E. coli*, le degré de polymérisation varie de 5 à 12 glucoses avec des espèces majoritaires comportant 8 ou 9 glucoses. Cette structure est fortement branchée. Le squelette glucanique est formé d'une courte chaîne de résidus de glucose liés en β -1,2 sur laquelle des branches, constituées d'une unité de glucose, sont liées en β -1,6 (Fig I-5 ; Schneider et coll., 1979). Des structures très similaires, à l'exception d'une légère différence dans le degré de polymérisation, sont trouvées pour les OPG produits par *Pseudomonas syringae* et *Erwinia chrysanthemi* (Talaga et coll., 1994 ; article 4 de cette étude). Les OPG de la famille I sont synthétisés par des Protéobactéries de la subdivision gamma (Tableau I-1).

Famille II : Les OPG de la famille II sont hétérogènes en taille. Le squelette est un glucane cyclique comportant de 17 à 25 résidus de glucose liés en β -1,2 (Fig I-5). Des molécules de plus grande taille (supérieure à 40 unités de glucose) ont été identifiés chez *S.*

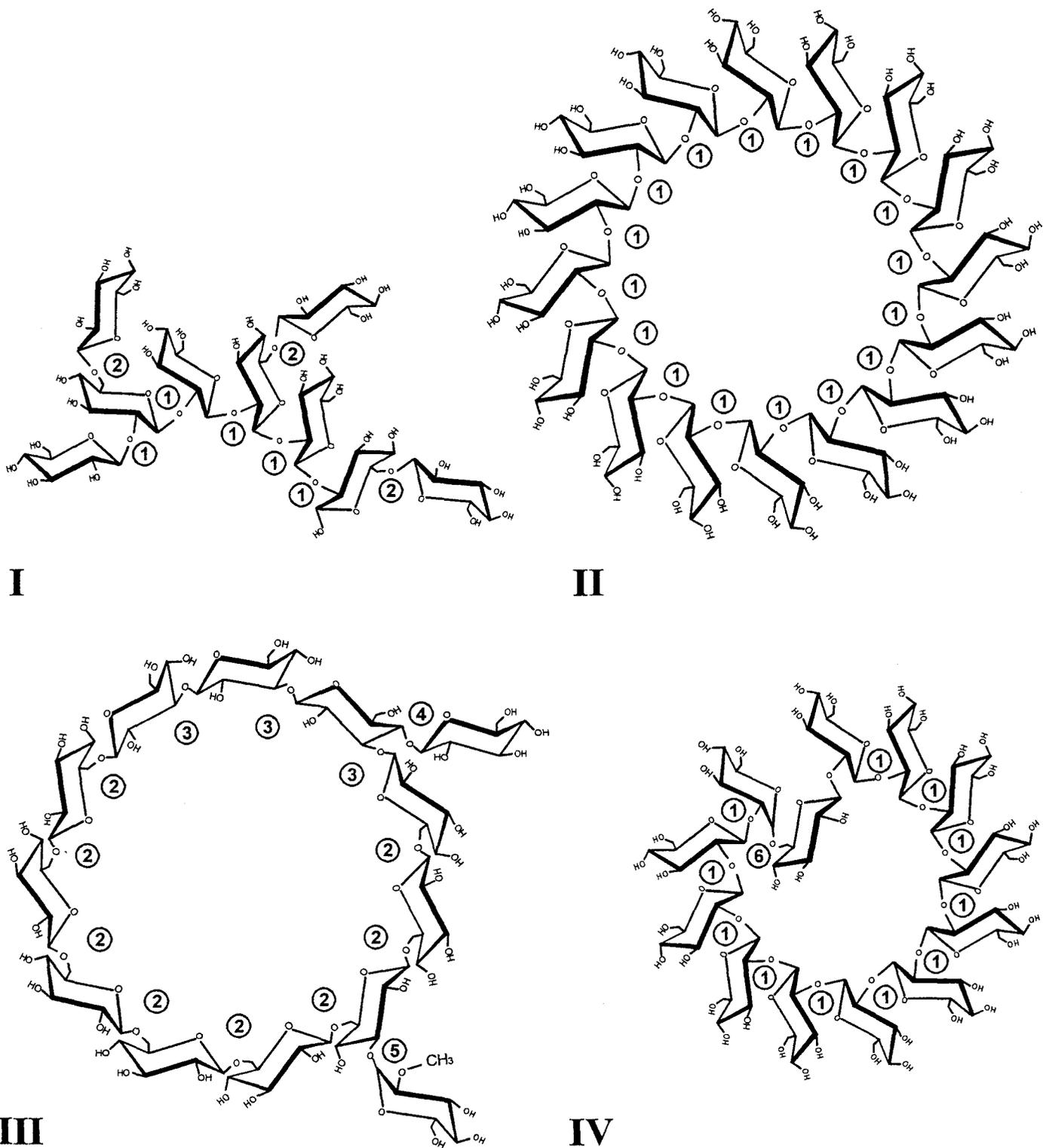


Figure I-5 : les quatre familles structurales des OPG (Bohin, 2000)

Tableau I-1 : Structures des OPG et gènes de biosynthèse chez les Protéobactéries (Bohin, 2000).

Species	OPG ¹ Family	Glc residues per mol.	Bonds	Substituents ²	Genome ³ sequencing	MdoG ⁴ similarity (%)	MdoH ⁴ similarity (%)	NdvB ⁴ similarity (%)
Gamma subdivision								
<i>Escherichia coli</i>	I	5-12	β -1,2 β -1,6	P-Gro P-Etn Suc	C	100 30	100	<5
<i>Salmonella typhi</i>	--	--	--	--	P	91 30	94	--
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	I	5-12	β -1,2 β -1,6	Suc Ace	N	82	71	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	--	--	--	P	73	65	--
<i>Pseudomonas syringae</i>	I	6-13	β -1,2 β -1,6	None	N	68	62	--
<i>Shewanella putrefaciens</i>	--	--	--	--	P	38	23	--
<i>Vibrio cholerae</i>	--	--	--	--	P	35	22	--
<i>Haemophilus influenzae</i>	--	--	--	--	C	<5	<5	<5
<i>Yersinia pestis</i>	--	--	--	--	P	--	--	--
<i>Xanthomonas campestris</i>	IV	16	β -1,2 α -1,6	None	N	--	--	--
Beta subdivision								
<i>Ralstonia solanacearum</i>	IV	13	β -1,2 α -1,6	None	N	--	--	--
<i>Bordetella pertussis</i>	--	--	--	--	P	--	--	--
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	--	--	--	--	P	--	--	--
<i>Nitrosomonas europaea</i>	--	--	--	--	P	88	90	--

Tableau I-1 : Structures des OPG et gènes de biosynthèse chez les Protéobactéries (Bohin, 2000).

Species	OPG ¹ Family	Glc residues per mol.	Bonds	Substituents ²	Genome ³ sequencing	MdoG ⁴ similarity (%)	MdoH ⁴ similarity (%)	NdvB ⁴ similarity (%)
Alpha subdivision								
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	IV	18	β -1,2 α -1,6	Suc Ace	N	34	17	–
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	–	–	–	–	P	35	17	–
<i>Brucella abortus</i>	II	17-25	β -1,2	None	N	–	–	51
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	II	17-25	β -1,2	P-Gro Suc MeMal	N	–	–	100
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	III	10-13	β -1,3 β -1,6	P-Cho	N	–	–	–
<i>Azospirillum brasilense</i>	III	12-13	β -1,3 β -1,6 β -1,4 α -1,3	Suc	N	–	–	11
<i>Caulobacter crescentus</i>	–	–	–	–	P	–	19	–
<i>Rickettsia prowazekii</i>	–	–	–	–	C	<5	<5	<5

¹ See text for further detail.

² Abbreviations: P-Gro, phosphoglycerol; P-Etn, phosphoethanolamine; P-Cho, phosphocholine; Ace, acetyl; Suc, succinyl; MeMal, methylmalonyl.

³ Genome sequencing project: C, complete; P, in progress, N, not available.

⁴ Protein similarities were determined by comparing Blast2 scores (tblastn, protein sequence against genomic DNA translated in all six reading frames). Scores for MdoG, MdoH, and NdvB, were 1017, 1650, and 5644, respectively.

meliloti (Breedveld et Miller, 1994). Ces OPG sont produits par les Rhizobiacées (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Brucella*) qui appartiennent à la subdivision alpha des Protéobactéries (Tableau I-1).

Famille III : Les OPG de la famille III sont constitués d'un squelette glucanique cyclique branché dont les résidus de glucose, composant le cycle, sont liés en β -1,3 et β -1,6 (Fig I-5). Ces OPG sont produits par *Bradyrhizobium* spp. et *Azospirillum brasilense* (Rolin et coll., 1992; Altabe et coll., 1998). L'analyse des OPG produits par *A. brasilense* en chromatographie d'échange d'anions à haute pH (Dionex) montre trois sous-espèces (I, II, III). La sous espèce I est composée de 12 résidus de glucose, trois sont liés en β -1,3, huit en β -1,6 et une unité est branchée sur le cycle en β -1,4. La sous espèce II dérive de la première et porte en plus une branche composée d'un résidu de glucose lié en α -1,3. La sous espèce III dérive de la deuxième et porte un 2-O-méthyl sur le glucose lié en alpha (Altabe et coll., 1998). La taille du cycle est donc plus contrôlée que celle des OPG de la famille II. Ces OPG sont présents chez des Protéobactéries de la subdivision alpha (Tableau I-1)

Famille IV : Les OPG de la famille IV comportent un squelette glucanique cyclique de taille homogène (DP 13 chez *Ralstonia solanacearum*; DP16 chez *Xanthomonas campestris*, DP18 chez *Rhodobacter sphaeroides*) (Talaga et Coll, 1996; York W.S., 1995; article 1 de cette étude). Les unités de glucose composant le cycle sont liées par des liaisons β -1,2 à l'exception d'une liaison α -1,6 (Fig I-5). Ces structures sont fortement contraintes ce qui contraste par rapport aux cycles β -1,2 de la famille II (Lippens, 1996a et 1996b). Ces OPG sont issus de Protéobactéries appartenant à trois subdivisions différentes (*R. sphaeroides* : alpha, *R. solanacearum* : bêta, *X. campestris* : gamma) (Tableau I-1).

III.1.2 La substitution des OPG

Chez plusieurs espèces, le squelette glucanique des OPG peut être modifié par différents substituants (Tableau I-1). Ceux-ci proviennent soit des têtes polaires des phospholipides de la membrane : phosphoglycérol, phosphoéthanolamine et phosphocholine; soit du métabolisme intermédiaire : acétyle, succinyle, méthylmalonyle. Pour ces derniers, le substrat donneur est certainement sous forme acyl-CoA, mais aucune donnée expérimentale ne le démontre.

Il apparaît donc que les OPG peuvent être neutres ou chargés. L'absence de substituant ou la substitution par des résidus d'acétyle conduit à la synthèse d'OPG neutres. La substitution par la phosphoéthanolamine ou la phosphocholine apporte un substituant zwitterionique qui ne confère pas de charge dans les conditions de pH neutre. Par contre, la substitution par le phosphoglycérol, le succinyle ou son isomère, le méthylmalonyle, confère un caractère acide ou anionique aux OPG.

Chez *E. coli*, les OPG sont très hétérogènes. En plus des variations au niveau du squelette glucanique (variation du degré de polymérisation et variation du nombre et des positions des branches), la substitution par le phosphoglycérol, le succinyle et la phosphoéthanolamine est extrêmement variable. Ainsi, les OPG sont un ensemble de glucanes modifiés par une combinaison de 0, 1, 2 ou 3 substituants de trois natures différentes. Chez *E. coli* les OPG sont ainsi majoritairement et fortement anioniques (jusqu'à cinq charges négatives par molécule).

Chez *Rhizobium*, les OPG peuvent être substitués par du phosphoglycérol, des résidus de succinyle et de méthylmalonyle (Miller et coll., 1988 ; Hisamatsu et coll., 1987). Le taux de substitution des OPG peut varier au sein des différentes espèces de *Rhizobium*. Par exemple, les OPG produits par certaines souches de *R. leguminosarum* et par *Rhizobium* sp. GRH2 ne sont pas substitués (Lopez-Lara et coll., 1993; Zevenhuizen et coll., 1990), alors que 90% des glucanes produits par *S. meliloti* et *Rhizobium* sp. NGR234 sont substitués (Batley et coll., 1987; Miller et coll., 1988). D'autre part, il est observé chez *S. meliloti* des variations dans la substitution en fonction du milieu de culture. Le passage dans un milieu de haute osmolarité inhibe le transfert de phosphoglycérol (Breedveld et Miller, 1995) et dans un milieu carencé en phosphate le caractère anionique des OPG diminue, n'étant plus conféré que par les résidus de succinyle (Breedveld et Coll, 1995a). Dans les mêmes conditions, des OPG d'*A. tumefaciens* sont neutres, c'est à dire dépourvus de phosphoglycérol et de succinyle.

La substitution par les composés de phosphoglycérol, de phosphoéthanolamine ou de phosphocholine, chez *E. coli* et *S. meliloti* ou *B. japonicum* s'effectue par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester sur l'hydroxyle en position 6 des résidus de glucose (Schneider et Kennedy, 1978 ; Miller et coll., 1986 ; Rolin et coll., 1992). La position, sur le glucane, des substituants O-ester n'est pas connue.

III.2 Les gènes et la biosynthèse des OPG.

L'identification des gènes impliqués dans la synthèse des OPG ne peut être réalisée simplement en raison de l'absence de phénotype associé à un défaut au niveau des OPG. La progression du séquençage de 89 génomes bactériens et leur analyse ont permis une grande avancée dans la compréhension de la conservation des gènes impliqués dans la synthèse des OPG.

III.2.1 La biosynthèse des OPG de la famille I

Chez *E. coli*, les deux gènes *mdoGH* sont nécessaires à la synthèse des OPG. MdoH, produit du gène *mdoH*, est une protéine de 97 kDa intégrée dans la membrane cytoplasmique. Debarbieux et coll. (1997) ont mis en évidence son organisation dans la membrane : MdoH possède huit segments transmembranaires et trois larges régions cytoplasmiques (Fig. R1). MdoH est nécessaire à l'activité β -1,2-glucosyltransférase qui permet *in vitro* la synthèse de chaîne β -1,2-polyglucose linéaire à partir du nucléotide sucre précurseur, l'UDP-Glc, en présence d'octyl- β -D-glucoside et d'ACP (acyl carrier protein) (Kennedy, 1996). Le groupement prosthétique de l'ACP n'est pas nécessaire à l'activité de polymérisation *in vitro* (Therisod et Kennedy, 1987). Tang et coll. (1997) ont défini les domaines et acides aminés de l'ACP essentiels à l'augmentation de l'activité de polymérisation. Weissborn et coll. (1991) observent une inhibition en présence d'antibiotiques qui complexe les polyprényl phosphates. Cependant, Harkness et coll. (1990) ont montré que l'activité de polymérisation n'est pas inhibée par la collicine M. La synthèse des OPG, contrairement à la synthèse d'autres composés polysaccharides, ne semble pas passer par la formation d'un précurseur polyglucosidique associé au polyprénol pyrophosphate. La région centrale cytoplasmique de MdoH présente les caractéristiques des glucosyltransférases de la famille 2 (Bohin, J.-P., 2000). Debarbieux et coll. (1997) postulent que les segments transmembranaires forment un canal qui permet la translocation vers le périplasme des chaînes en cours de synthèse dans le cytoplasme.

MdoG est une protéine périplasmique dont la fonction n'est pas établie mais sa présence est requise pour la polymérisation. Bohin (2000) postule que la protéine MdoG, en coopération avec MdoH, catalyserait l'addition des branches sur les chaînes émergeant dans le périplasme. Des gènes similaires à *mdoGH* ont été identifiés chez *E. chrysanthemi* (Page et coll., 2001) et *P. syringae* (Loubens et coll., 1993).

La recherche systématique de gènes similaires à *mdoG* et *mdoH*, dans les banques de données, révèle la présence de gènes conservés chez plusieurs bactéries appartenant à la subdivision gamma des Protéobactéries (tableau I-1) et le niveau de similitude est en adéquation avec l'éloignement phylogénétique de ces espèces (Bohin, 2000). Cependant, cette analyse montre que plusieurs espèces appartenant à la subdivision gamma dont les génomes sont complètement (ou virtuellement) séquencés, ne présentent aucune similitude avec *mdoG* ou *mdoH* ni avec aucun des gènes impliqués dans la synthèse des OPG d'autres familles structurales. Ceci est le cas pour *Yersinia pestis* et *Haemophilus influenzae*. Il est particulièrement étonnant de ne pas trouver de gènes similaires aux gènes *mdoGH* chez *Y. pestis* puisque récemment, ceux-ci ont été mis en évidence chez *Y. pseudotuberculosis*, espèce dont le génome présente 99% de similitude avec *Y. pestis* (Bohin, communication personnelle). A contrario, il est possible de mettre en évidence des gènes similaires à *mdoGH* chez des espèces de la subdivision alpha et bêta (*Nitrosomonas europae*, *R. capsulatus*).

Les analyses des données de séquences sur les génomes bactériens ont permis de révéler l'existence d'un gène paralogue à *mdoG*, *mdoD*, chez *E. coli* et *S. typhi* (Bohin, 2000). L'inactivation de *mdoD* chez *E. coli* conduit à l'augmentation du degré de polymérisation et à la diminution relative du taux de branchement des OPG (Lequette, 1998).

III.2.2 La biosynthèse des OPG de la famille II

Chez *S. meliloti*, deux gènes ont été identifiés : *ndvB* et *ndvA* (Tableau I-1, Breedveld et Miller, 1994). NdvB est une protéine de la membrane cytoplasmique de très grande taille, 319 kDa. Seulement 60% de la partie N-terminale sont nécessaires à la synthèse des glucanes. Le test *in vitro* de l'activité β -1,2-glucosyltransférase associée à la protéine NdvB est plus efficace que celui réalisé sur Mdo ; il nécessite également le précurseur UDP-Glc.

Un intermédiaire de synthèse est mis en évidence, dans les tests utilisant un précurseur marqué ; il s'agit d'une protéine membranaire de haut poids moléculaire fixant la radioactivité, probablement de la protéine NdvB (Zorreguieta et Ugalde, 1986).

La protéine NdvA est également une protéine de la membrane cytoplasmique présentant des similitudes avec le domaine fixateur d'ATP des transporteurs ABC. Les mutants *ndvA* synthétisent des OPG cytoplasmiques et non modifiés. Les similitudes significatives avec la protéine HlyB du système de sécrétion de type I, a permis de suggérer que la protéine NdvA serait impliquée dans la translocation des OPG dans le périplasme,

voire dans le milieu extérieur. En effet, il a été mis en évidence chez certaines rhizobiacées une sécrétion d'OPG dans le milieu de culture (Standfield, 1988).

Des gènes très similaires aux gènes *ndvB* et *ndvA* ont été trouvés chez *A. tumefaciens* (*chvA* et *chvB*), chez *S. fredii* (*ndvB*) et chez *B. arbutus* (*cgs*) (Inön de Iannino et coll., 1998). Ces gènes sont strictement homologues et peuvent compléter le défaut de biosynthèse d'un mutant *ndvB* chez *S. meliloti*. Tous ces gènes sont impliqués dans la synthèse des OPG de la famille II. La recherche systématique de gènes similaires au gène *ndvB* dans les banques de données (tableau I-1) ne donne pas de similitude significative à l'exception du gène *cvi*, chez *A. brasilense*, qui serait impliqué dans la synthèse des OPG, membres de la famille III (Raina et coll., 1995).

III.2.3 La biosynthèse des OPG de la famille III

Formulant l'hypothèse que, malgré les différences structurales, les OPG assuraient une même fonction chez les différentes espèces, Bhagwat et coll. (1999) ont isolé un cosmide portant une partie du génome de *B. japonicum* capable de compléter les déficiences associées aux mutants *ndvB* chez *S. meliloti*. Ce cosmide contient l'information génétique permettant la synthèse d'OPG de la famille III. Deux gènes liés *ndvB* et *ndvC* ont été caractérisés. Les produits de ces gènes, NdvB (102kDa) et NdvC (62kDa) sont probablement des protéines liées à la membrane. L'inactivation du gène *ndvB* a pour conséquence l'absence de synthèse des OPG. Par contre, l'inactivation du gène *ndvC* ne réduit pas la synthèse d'OPG ; cependant leur structure est modifiée. En effet, Les OPG produits sont cycliques et ne contiennent que des liaisons β -1,3-glucosidiques (Pfeffer et coll., 1996). La protéine NdvB de *B. japonicum* ne présente aucune similitude avec la protéine NdvB de *S. meliloti*, mais elle appartient à la même famille de glucosyltransférase que MdoH (Bohin, 2000). NdvC présente des similitudes significatives avec des gènes de levure impliqués dans le métabolisme de glucanes. Par conséquent, on peut imaginer que la protéine NdvB initie la polymérisation d'un glucane β -1,3, puis que la protéine NdvC ajoute des résidus de glucose en β -1,6 ou remanie le glucane synthétisé par NdvB.

III.2.4 Le transfert des substituants sur les OPG

Chez *E. coli* et chez *Rhizobium*, les glucanes neutres sont les précurseurs des glucanes chargés (Geiger et coll., 1991 ; Lequette et Bohin, communication personnelle) et le transfert du phosphoglycérol se déroule dans le compartiment périplasmique.

Le gène *mdoB*, chez *E. coli*, code une protéine nécessaire à la substitution des OPG par le phosphoglycérol. Deux activités phosphoglycéroltransférasiques sont décrites chez *E. coli*. La phosphoglycéroltransférase I est associée à la membrane et catalyse le transfert de phosphoglycérol à partir du phosphatidyl-glycérol, sur les OPG mais également sur l'arbutine (Jackson et Kennedy, 1983). L'arbutine est un phényl- β -glucoside et son activité en tant qu'inhibiteur compétitif de la substitution des OPG par le phosphoglycérol constitue un argument en faveur du transfert primaire de ce substituant au niveau de la membrane cytoplasmique. De plus, il n'est pas possible d'obtenir le transfert de phosphoglycérol sur les OPG libres à partir du phosphatidylglycérol de la membrane. La phosphoglycéroltransférase II est une protéine de 56 kDa, soluble dans le périplasme qui transfère le phosphoglycérol d'une molécule d'OPG naissante à une autre soluble dans le périplasme (Goldberg et coll., 1981; Bohin et Kennedy, 1983).

Il a été récemment montré que le produit du gène *mdoB* existe sous deux formes : l'une, MdoB, liée à la membrane par quatre segments transmembranaires et d'un poids moléculaire de 85kDa, est responsable de l'activité phosphoglycéroltransférase I (Lanfroy E., 1997) ; l'autre, MdoB', soluble et d'un poids moléculaire de 56 kDa, est produite par le clivage de MdoB et est responsable de l'activité phosphoglycéroltransférase II (Lequette Y., 1998).

Chez *S. meliloti*, le gène *cgmB* code une protéine soluble ne présentant aucune similitude avec son homologue MdoB. De plus, la protéine CgmB est capable de transférer du phosphoglycérol sur les OPG libres (Wang, 1999). Ces deux OPG-phosphoglycéroltransférases possèdent donc des modes d'action différents.

III.3 La régulation de la biosynthèse des OPG

Deux niveaux de régulation de la biosynthèse des OPG sont mis en évidence : la régulation en fonction de l'osmolarité du milieu et le rétrocontrôle de la synthèse en fonction de la concentration périplasmique des OPG (Bohin, 2000).

Chez *E. coli*, la synthèse des OPG est abondante lorsque l'osmolarité du milieu est très basse. Dans le milieu LOS (Low Osmolarity, 70 mosM), par exemple, les OPG représentent 5% du poids sec et l'augmentation de l'osmolarité du milieu réduit rapidement cette quantité qui ne représente plus que 0,5% à 600 mosM (Lacroix, 1989). L'osmorégulation des OPG est une constante. Elle a été mise en évidence chez toutes les espèces testées à l'exception de quelques souches de *Brucella* et de la souche GR4 de *S. meliloti*.

Si l'osmolarité du milieu de culture des cellules d'*E. coli* est diminuée brutalement, la synthèse d'OPG augmente, et la concentration en OPG, caractéristique du nouveau milieu, est atteinte en un peu plus d'une génération (Lacroix, 1989). Par contre, si l'osmolarité du milieu est augmentée brutalement, alors la synthèse des OPG s'arrête rapidement mais la concentration en OPG ne diminue qu'après plusieurs générations. Les OPG ne sont pas dégradés et la dilution s'effectue aux cours des divisions cellulaires (Lacroix, 1989). La stabilité des OPG est également observée chez *S. meliloti* (Breedveld et Miller, 1994). Il existe donc un délai entre le stress et la réponse.

La régulation peut s'exercer à deux niveaux : au niveau de l'expression des gènes de biosynthèse et/ou au niveau de l'activité des enzymes de biosynthèse.

Chez *E. coli* et *S. meliloti*, l'activité de polymérisation du glucose mesurée ne varie pas quelque soit l'osmolarité du milieu de culture des cellules à partir desquelles les extraits membranaires ont été préparés (Rumley et coll., 1992 ; Miller et Wood, 1996). De plus, l'augmentation de l'osmolarité dans ces essais (par addition de saccharose, de tréhalose, de proline ou de bétaine) n'affecte pas l'activité de polymérisation. L'augmentation de la force ionique réduit par contre cette activité (Rumley et coll., 1992). Il a donc été formulé l'hypothèse suivante : la diminution de la synthèse des OPG pour des cellules en croissance dans un milieu de haute osmolarité résulte de l'accumulation d'ions dans le cytoplasme. Or, Lacroix (1989) a montré que le taux de synthèse est constant, en phase exponentielle, pour une osmolarité donnée, et donc, puisque l'accumulation d'ion potassium en réponse à un choc hyperosmotique n'est que transitoire (Csonka et Epstein, 1996) ; on peut imaginer qu'un autre processus intervient dans la régulation. Il a été proposé que la chute brutale du taux de synthèse est due à la diminution de l'expression d'une protéine au renouvellement rapide sans exclure l'inhibition transitoire de l'activité de synthèse (Bohin et Kennedy, 1984b; Lacroix, 1989). Lacroix et coll. (1991) ont constaté grâce à des expériences de fusion traductionnelle avec le gène rapporteur *lacZ* ($MdoH^+$ -*lacZ*) ou par quantification des ARNm, que l'expression de l'opéron *mdoGH* est soumise à une régulation par l'osmolarité.

Le facteur sigma alternatif, σ_E , fait partie de la sous famille des facteurs sigma régulant les fonctions extracytoplasmiques. La présence de protéines mal conformées dans l'enveloppe induit l'expression du régulon σ_E . Très récemment, Dartigalongue et coll (2001) ont montré que l'opéron *mdoGH* est contrôlé par le facteur σ_E . Ceci confirme l'implication d'une régulation transcriptionnelle de l'activité de biosynthèse des OPG. C'est aussi l'indication d'un probable troisième niveau de régulation.

Contrairement à ce qui est observé chez *E. coli* et *S. meliloti*, l'activité de polymérisation associée aux préparations membranaires dépend chez *A. brasilense* de l'osmolarité du milieu de culture. Ainsi, il apparaît que la régulation des OPG s'effectue, selon les espèces, au niveau de l'expression des gènes et/ou au niveau de l'activité des protéines (Bohin, 2000).

Le rétrocontrôle est observé chez *E. coli*. En effet une souche *pgi*, *zwf* est incapable de synthétiser des OPG sans source de glucose dans le milieu. On constate qu'après addition de glucose la synthèse d'OPG augmente jusqu'à atteindre la quantité qui serait normalement produite par une souche sauvage et ce quel que soit l'osmolarité. Le rétrocontrôle est également observé chez *R. leguminosarum*. En effet, dans des conditions particulières (forte concentration en sel, par exemple), certaines souches sécrètent dans le milieu et de façon continue des OPG. Dans ce cas, les OPG sécrétés ne participent plus au rétrocontrôle et dans ces conditions la quantité d'OPG synthétisée est supérieure au g/l.

III.4 Les fonctions attribuées aux OPG

III.4.1 Les phénotypes pléiotropes des mutants *Opg*⁻

L'étude des caractères exprimés chez les souches incapables de produire des OPG montre un phénotype essentiellement pléiotrope qui peut présenter quelques variations selon l'espèce considérée. Dans tous les cas, le phénotype pléiotrope indique une probable altération des propriétés de l'enveloppe.

Chez *A. tumefaciens* et *S. meliloti*, les souches *Opg*⁻ présentent un défaut de croissance à basse osmolarité (Breedveld et Miller, 1994). Cependant, chez *E. coli* et *E. chrysanthemi*, la croissance d'une souche *Opg*⁻ n'est que faiblement affectée (Kennedy, 1996 ; Page, 2001).

Chez *E. coli*, les mutants déficients dans la synthèse des OPG présentent une modification du rapport des porines (augmentation de l'expression de *OmpC*) ; une résistance à l'expression endogène de la protéine de lyse MS2 et une augmentation de la production de l'acide colanique. La résistance à la protéine de lyse MS2 est à prendre au conditionnel puisque la reproduction de ces résultats dans notre laboratoire n'a pas été obtenue. Le modèle proposé pour l'expression des gènes de biosynthèse de la capsule (gènes *cps*) est que les OPG agiraient directement ou indirectement sur le système capteur/régulateur, *RcsC* /*RcsB*.

Le phénotype mucoïde des colonies formées par les mutants *Opg⁻* est également observé chez les Rhizobiacées et chez *E. chrysanthemi*.

Quelque soit l'espèce considérée, la motilité et le chimiotactisme sont altérés. La réduction de la synthèse de flagelline en serait la cause (Fiedler et Rotering, 1988).

Chez toutes les espèces testées, les mutants déficients dans la synthèse des OPG sont incapables d'interagir avec leur hôte. Dans le cas de bactéries fixatrices d'azote, les souches *Opg⁻* n'effectuent pas de symbiose ; et dans le cas d'espèce pathogène pour un hôte animal ou végétal, ces souches sont non virulentes ou atténuées. Ces observations ont été faites suite à la caractérisation des mutants isolés au cours de cribles ou de sélections pour des souches non-virulentes ou atténuées, ou au cours de mutagenèses dirigées.

Les mutants, *chvA* ou *chvB*, chez *A. tumefaciens* ne sont plus virulents (Douglas et coll., 1985). Les mutants au locus *hrpM*, chez *P. syringae*, sont incapables d'induire les symptômes de la maladie sur les plantes hôtes ni de provoquer la réaction d'hypersensibilité sur les plantes non-hôtes (Mills et Mukhopadhyay, 1990 ; Loubens et coll., 1993). De façon similaire, les mutants *ndvA* et *ndvB* entraînent la formation de nodules vides ne fixant pas l'azote (Dylan et Coll, 1986; Stanfield et coll., 1988; Ielpi et coll., 1990). En sus de ces résultats obtenus suite à la caractérisation des mutants défectueux dans les interactions avec l'hôte, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'aboutir à des conclusions identiques. En effet, l'inactivation du gène *ndvB* chez *B. japonicum* abolit la synthèse des OPG (de la famille III) et la souche mutante construite induit la formation de nodules non fixateurs d'azote. De même, l'interruption des gènes *opgG* et *opgH* chez *E. chrysanthemi*, produit des souches *Opg⁻* incapables de provoquer la macération des tissus végétaux. Page et coll. (2001) notent également chez *E. chrysanthemi* une réduction de l'expression et de la sécrétion des exoenzymes (protéases, cellulases, pectate-lyases) et un défaut de croissance *in planta* qui ne peut-être complémenté *in trans* lors de co-inoculation avec la souche sauvage.

Enfin, le rôle des OPG dans les interactions avec l'hôte animal a été mis en évidence lors d'expériences réalisées sur *Salmonella typhimurium*, agent pathogène chez la souris, et *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste chez l'homme. En effet, Bowe et coll. (1998) ont criblé 330 clones produits d'une mutagenèse *MudJ*, chez *S. typhimurium*, et isolé 12 mutants fortement atténués dont la dose létale à 50% (LD_{50} : provoquant 50% de mortalité sur une souche sensible de souris) est 1000 fois supérieure à la LD_{50} de la souche de référence. Parmi ces mutants atténués, l'une des insertions de *MudJ* interrompt un gène identique à *mdoB*. L'autre étude a été réalisée sur une souche particulière de *P. aeruginosa*, PA14, à partir

de laquelle des tests de pathogénicité sur plusieurs hôtes ont été développés (Rhame et coll., 1995 et 1997; Tan et coll., 1999). Ce modèle constitue un outil puissant pour l'étude des interactions hôte-bactérie pathogène puisqu'il inclut trois hôtes pour lesquels de nombreuses études génétiques sont entreprises. Ces hôtes sont le ver, *Caenorhabditis elegans*, la plante, *Arabidopsis thaliana*, et la souris, *Mus musculus*. Sur 3300 mutants par insertion de *TnphoA* analysés, Mahajan-Miklos et coll. (1999) ont isolé 7 mutants ne provoquant pas la mort rapide du ver, *C. elegans*, après ingestion. L'un de ces clones possède une insertion dans le locus *hrpM* et, contrairement à la souche sauvage, ne tue pas la souris et n'est pas capable de croître dans les feuilles d'*A. thaliana*.

III.4.2 L'importance de la structure pour la fonction

1/ la structure du squelette

La structure du squelette glucanique des OPG ne semble pas avoir une stricte influence sur les fonctions végétatives (motilité, croissance à basse osmolarité). Par contre, celle-ci peut avoir dans une certaine mesure une influence sur les interactions avec l'hôte. En effet, il est possible, chez *S. meliloti*, de compléter une mutation *ndvB* qui abolit la synthèse des OPG cycliques β -1,2, par l'expression des gènes de *B. japonicum*. Dans ce cas, l'expression des gènes de *B. japonicum* permet la synthèse d'OPG neutres cycliques β -1,3 branchés qui restaurent plusieurs phénotypes : motilité, croissance à basse osmolarité et formation de nodules efficaces (Bhagwat et coll., 1993 ; Pfeffer et coll., 1996). Cette observation corrobore l'idée que, malgré la diversité structurale des OPG, ceux-ci ont une fonction commune.

Par contre, chez *B. japonicum*, un mutant *ndvC* qui produit des OPG cycliques dont les liaisons glucosidiques sont essentiellement de type β -1,3 au lieu de β -1,3; β -1,6, est toujours capable de croître à basse osmolarité et de se mouvoir mais est incapable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec le soja (*Glycine max*) (Bhagwat et coll., 1996 ; Dunlap, 1996).

1/ les substituants

Les substituants ne sont pas présents sur tous les OPG. De plus, les propriétés conférées par chacun d'eux sont très différentes. Il est donc difficile d'imaginer un rôle commun.

Dans le cas des substituants dérivant des phospholipides, on peut remarquer que leur transfert sur les OPG produit du di-acylglycérol (DAG). Le DAG constitue un messager secondaire chez les cellules eucaryotes. Ainsi, on peut supposer que les OPG représentent un intermédiaire dans la voie de transduction de certains signaux. Dans ce cas, la substitution des OPG ne serait qu'un sous-produit de la production de DAG.

Les substituants des OPG sont assez fréquemment anioniques. Chez *E. coli*, les OPG sont très anioniques et Kennedy a donc formulé l'hypothèse qu'ils participent à la formation d'un potentiel de Donnan à travers la membrane externe (Kennedy, 1996).

Les porines sont majoritairement fermées *in vivo*. Delcour et coll. (1992) ont montré que les OPG peuvent promouvoir *in vitro* la fermeture des porines. La fermeture des canaux est favorisée uniquement lorsque le potentiel appliqué à la membrane externe est inverse au potentiel de Donnan. Lors d'un passage d'un milieu de basse à haute osmolarité, la fermeture des porines dépendantes de la présence des OPG favoriserait ainsi une adaptation rapide. Cependant, des résultats similaires peuvent être obtenus avec de la phosphoéthanolamine. Delcour et coll. pensent que la fermeture des porines peut-être régulée par plusieurs composants ou facteurs dont les OPG peuvent faire partie. La fraction des OPG la plus efficace dans la fermeture des porines est celle qui porte uniquement des substituants phosphoéthanolamine.

D'autre part, on peut constater que les substituants augmentent le nombre de sous fractions des OPG. Chez certaines espèces et dans certaines conditions, le rapport de chacune des fractions varie. Si on considère que chaque fraction a des interactions ou des propriétés spécifiques, alors les substituants permettraient une certaine adaptation, éventuellement spécifique à chaque espèce.

Enfin, le seul indice permettant de dire que les substituants des OPG peuvent avoir un rôle vient de l'étude de *S. typhimurum*. En effet, chez cette espèce il a été mis en évidence que l'une des souches mutantes les plus atténuées possédait une insertion dans un gène homologue à *mdoB* (Bowe et coll., 1998).

III.4.3 La réversion des phénotypes des souches Opg⁻

Fiedler et Roterling (1988) ont étudié, chez *E. coli*, un clone pseudo-révertant Opg⁻ dont la motilité est restaurée. L'analyse des autres phénotypes associés aux mutations Opg⁻ montre que ce mutant n'exprime plus la porine OmpC et ne forme plus de colonies muqueuses à basse température. La mutation suppressive a été localisée au locus *ompB* (*ompR*, *envZ*).

Ces auteurs suggèrent que l'expression des flagelles est également régulée par le régulon *envZ/ompR* au même titre que les locus *phoE*, *lamB*, *mal...* Leur hypothèse peut être confirmée par les résultats obtenus par Shin et Park (1995). Ces auteurs ont montré que OmpR régule négativement l'opéron maître *flhDC*. On peut donc imaginer que le pseudo-révertant obtenu réduit la phosphorylation de OmpR, ce qui permet l'expression des flagelles et empêche l'expression de OmpC.

Chez *S. meliloti*, deux types de pseudo-révertants ont été isolés (Dylan et coll., 1990). Les premiers sont sélectionnés pour la restauration de la motilité. Ces pseudo-revertants regagnent également partiellement d'autres fonctions dites végétatives comme la croissance à basse osmolarité et la capacité d'attachement à la plante. La relation symbiotique s'établit dans 10% des cas. Le second type de pseudo-révertants est isolé pour la capacité à établir une relation symbiotique. Dans ce cas, la relation symbiotique s'établit avec une efficacité de 60%. Les fonctions végétatives sont peu ou pas restaurées. Ces pseudo-révertants ne sont pas motiles, leur croissance à basse osmolarité n'est pas restaurée, l'efficacité de fixation à la plante et d'initiation des cordons d'infection n'est pas augmentée. Un locus a été isolé à partir d'une banque génomique issu d'un pseudo-révertant de ce dernier type (Nagpal et coll., 1992). Le cosmide isolé introduit dans une souche *ndvB* ou *ndvA* restaure partiellement la formation de nodosités fonctionnelles. Ce locus contient des gènes *exo*. Une mutagenèse par insertion de Tn5 et des sous-clonages montrent que les deux gènes *exoH* et *exoF* sont nécessaires à la restauration. Ceux-ci sont fonctionnels. *exoH* code la succinyltransférase du succinoglycane, *exoF* code une protéine située du côté périplasmique de la membrane qui aurait pour fonction de coupler la synthèse et l'exportation des unités octasaccharidiques liées composant le succinoglycane (Leigh et Walker, 1994). Les auteurs ne décèlent pas d'oligosaccharides neutres de tailles équivalentes aux OPG dans le périplasme des pseudo-révertants. Par contre ils constatent une augmentation des exopolysaccharides et la présence dans le surnageant d'oligosaccharides neutres de tailles intermédiaires (Nagpal et coll., 1992).

Chez *A. tumefaciens*, certains phénotypes des souches Opg⁻ sont exacerbés par l'ajout de CaCl₂ 7mM : réduction de la motilité et croissance ralentie (Swart et coll., 1994a). Les auteurs spéculent que les OPG permettent de stabiliser les membranes. Cependant, dans une étude complémentaire, ils obtiennent la restauration de plusieurs phénotypes en cultivant les mutants *chvB* en présence de CaCl₂ 7 mM et NaCl 100mM (Swart et coll., 1994b). Le défaut d'attachement à la plante est dû à la production de rhicadhésines inactives (protéine de la surface bactérienne qui lie le calcium), l'apport de chlorure de sodium et de calcium restaure

la synthèse d'une forme fonctionnelle (Swart et coll., 1994b). Le pré-traitement des plantes par de la rhicadhésine purifiée restaure également la virulence des mutants *chvB* (Swart et coll., 1993). Banta et coll. (1998) ont montré que la protéine VirB10 qui intervient dans le transfert de l'ADN-T a une stabilité dépendant de la température. Cette instabilité est exacerbée chez les mutants *chvB*. Ces auteurs montrent que la virulence des mutants *Opg⁻* peut être partiellement restaurée si l'incubation s'effectue à basse température (Banta et coll., 1998). Par contre, ils ne reproduisent pas la restauration partielle de la virulence par addition de CaCl_2 7mM et NaCl 100mM (Banta et coll., 1998).

La capacité à établir une symbiose peut être restaurée chez les mutants déficients dans la synthèse des facteurs Nod ou du succinoglycane par addition de ces composés lors de l'inoculation. Contrairement à ces molécules signal, chez *S. meliloti* (Dylan et coll., 1990) et *A. tumefaciens* (Swart et coll., 1993), le défaut d'interaction des souches *Opg⁻* vis-à-vis de l'hôte ne peut être compensé par co-inoculation avec des OPG. De même, chez *E. chrysanthemi* (Page et coll., 2001) lors de co-inoculation dans un rapport 99/1 de clones *Opg⁻* avec la souche sauvage, le tissu macéré formé contient une grande majorité de souche sauvage. Le dénombrement des souches mutantes montre qu'elles effectuent au plus une division dans la plante. La non-pathogénicité des souches *Opg⁻* n'est donc pas compensée par l'apport de composés en trans (Page et coll., 2001).

III.4.4 Les hypothèses formulées quant à la fonction des OPG

La première fonction attribuée aux OPG a été celle d'osmoprotectant (Kennedy, 1996 ; Miller et Wood, 1996). En effet, il est constaté un défaut de croissance dans les milieux de basse osmolarité pour les souches *Opg⁻* chez certaines espèces (rhizobiacée). Cependant ce phénotype n'est pas partagé (*E. coli*, *E. chrysanthemi*). D'autre part, les phénotypes observés pour les souches *Opg⁻* peuvent également être observés à plus haute osmolarité (exemples : défaut de motilité, défaut de sécrétion d'exoenzymes, perte de virulence). Par conséquent, l'osmoprotection ne semble pas être la seule fonction, voir la principale fonction des OPG (Cangelosi et coll., 1990 ; Bohin, 2000). Récemment, Cayley et coll. (2000) proposent que les OPG permettraient le maintien du volume périplasmique à basse et osmolarité modéré. Cependant, Oliver (1996) relève qu'en absence d'OPG, le volume périplasmique n'est pas modifié du fait certainement d'autres composants tel que le peptidoglycane et de l'état visqueux de ce compartiment.

Les OPG peuvent être des molécules signal pour des protéines périplasmiques ou liées aux membranes. Lorsque les bactéries passent d'un milieu de basse à haute osmolarité, les OPG ne sont pas dégradés et donc leur concentration est trop élevée par rapport aux nouvelles conditions. Cette inadéquation pourrait être perçue par une protéine. Ce capteur comptabiliserait le nombre de division nécessaire pour obtenir la dilution et donc la concentration adéquate des OPG et permettrait la mesure de la densité cellulaire lorsque celle-ci est très faible (Bohin, 2000).

Chez *E. coli*, l'absence d'OPG perturbe les systèmes capteur/régulateur EnvZ/OmpR et RcsC/RcsB (Fiedler et Roterling, 1988 ; Ebel et coll., 1997). Ces deux systèmes régulent respectivement l'expression des porines et la synthèse de la capsule en fonction de l'osmolarité du milieu. Il a donc été proposé que le capteur perçoit la concentration des OPG comme indicateur de l'osmolarité du milieu. Les mutants déficients dans la synthèse des OPG auraient ainsi un panel d'expression correspondant à un milieu de haute osmolarité quelque soit l'osmolarité réelle de celui-ci. Or, Geiger et coll. (1992) ont montré que l'expression anormale des porines s'effectue essentiellement à très basse osmolarité. L'addition d'une faible concentration en KCl suffit à restaurer une expression normale. Par contre, une augmentation équivalente de l'osmolarité par du saccharose exacerbe l'expression anormale des porines. D'autre part, les mutants *mdoH* surexpriment les gènes *cps*, impliqués dans la synthèse de la capsule, à un niveau équivalent à celui d'un mutant constitutif *rscC*. Or, lors d'un choc à haute osmolarité par addition de saccharose, ces mutants semblent capables de réduire la surexpression des gènes *cps* et, après un temps de réponse assez long, d'atteindre un niveau d'expression équivalent à celui d'une souche sauvage. La perturbation des systèmes capteur/régulateur EnvZ/OmpR et RcsC/RcsB ne peut donc pas être aussi simplement interprété. Une explication alternative est d'imaginer que l'absence d'OPG perturbe la membrane cytoplasmique. Les capteurs intégrés à la membrane et répondant à l'osmolarité seraient particulièrement sensibles à cette perturbation qui engendrait une conformation anormale et donc une réponse inadaptée. D'une façon similaire, chez *A. tumefaciens*, l'abondance de la protéine membranaire VirB10, qui fait partie du complexe permettant le transfert de l'ADN-T, diminue lorsque la température augmente. Cette réduction de la stabilité de VirB10 est exacerbée chez un mutant *chvB* (Banta et coll., 1998). Les OPG pourraient interagir et stabiliser les bicouches lipidiques des membranes internes et externes, et contribueraient directement à la stabilisation des complexes protéiques ou indirectement influenceraient la fluidité des membranes (Crowe et coll., 1984 ; Banta, 1998 ; Bohin, 2000).

Bhagwat et coll. (1999) ont montré chez *B. japonicum* que les OPG peuvent jouer le rôle de suppresseur des réponses de défense de la plante. Les OPG cycliques branchés β -1,3, β -1,6 réduisent la production par les graines de soja de phytoalexines induite par des glucanes branchés β -1,3, β -1,6 fongiques. Les mutants *ndvC* qui synthétisent des OPG cycliques β -1,3 induisent une production deux fois plus forte de glyceollines que les mutants déficients dans la synthèse des OPG et cinq fois plus forte qu'une souche sauvage. Les OPG cycliques β -1,3 sont dans ce cas de faible eliciteur des défenses contrairement aux OPG cycliques β -1,3, β 1,6 qui agissent comme des suppresseurs. Cependant cette fonction semble spécifique des OPG produits par *B. japonicum* chez qui cette propriété est nécessaire à l'établissement d'une symbiose. En effet, la synthèse d'OPG cyclique β -1,3 chez les mutants *ndvB* de *S. meliloti* restaure la formation de nodosités fixatrices d'azote (Bhagwat, 1999).

Les expériences réalisées chez *E. chrysanthemi*, *S. meliloti* et *A. tumefaciens* tendent à démontrer que la présence des OPG est requise dans le périplasme (Page et coll., 2001; Dylan et coll., 1990 ; Swart et coll., 1993). En conclusion, les OPG assurent donc une fonction commune dans le périplasme chez toutes les espèces. A cette fonction principale pourraient s'ajouter des fonctions spécifiques selon les espèces. Cette évolution des OPG aurait conduit à la diversité structurale observée.

RESULTATS

PARTIE I : LES GENES DE BIOSYNTHESE DES OPG DE LA FAMILLE IV CHEZ *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie des climats tempérés colonisant les eaux riches en matières organiques. Cette espèce est capable d'effectuer un grand nombre de métabolisme pour sa croissance : photoautotrophie, photohétérotrophie et chimiohétérotrophie. Depuis de nombreuses années, *R. sphaeroides* constitue un modèle d'étude de la photosynthèse bactérienne. Cette photosynthèse anoxygénique est induite en condition anaérobie et en présence de lumière, mais seule la réduction de la tension en oxygène suffit à induire la différenciation de la membrane interne en système membranaire intracytoplasmique, où résident les photosystèmes (Zeilstra-Ryalls et coll., 1998). Les études réalisées portent sur la structure et le fonctionnement du photosystème, mais aussi sur la régulation de la fonction photosynthétique (invagination de la membrane cytoplasmique, synthèse des pigments, édification du photosystème...) (Kiley et Kaplan, 1988 ; Lang et Hunter, 1994 ; Varga et Kaplan, 1993). Des outils génétiques ont donc été développés pour permettre l'identification des gènes impliqués dans ces processus.

R. sphaeroides appartient à la subdivision alpha-3 des Protéobactéries. Les espèces de cette subdivision possèdent un génome complexe formé de plusieurs chromosomes. C'est le cas de *R. sphaeroides* dont le génome est composé de deux chromosomes circulaires: CI de 3,0 Mpb et CII de 0,9 Mpb (Suwanto et Kaplan, 1989 et 1992). En 1997, Choudhary et coll. ont montré que certains gènes sont dupliqués sur CI et CII. D'autre part, une mutagenèse par Tn5 prouve que certaines voies métaboliques (synthèse de l'acide *p*-aminobenzoïque, de l'uracile, de l'histidine, et de la thymine) sont partagées entre les deux chromosomes plutôt que dupliquées (Choudhary et coll., 1994). Ces résultats montrent que le chromosome CII n'est pas un mégaplasmide dispensable, il constitue un élément génétique essentiel dont les informations sont nécessaires à la survie. Le séquençage de 0,3 Mpb sur les 0,9 Mpb du CII révèle 200 phases ouvertes de lecture ayant potentiellement des fonctions dans la synthèse des acides aminées, le système redox, le transport de nutriments et un certain nombre d'éléments régulateurs (Choudhary et coll., 1997). Le chromosome CII ne contient donc pas de gènes

spécifiques d'une fonction métabolique, d'un état physiologique ou de conditions de croissance particulières.

Puisque des études génétiques sont réalisables chez *R. sphaeroides*, nous avons entrepris la détermination structurale des OPG produits par cette espèce (**article 1**). Cette analyse a révélé l'appartenance des OPG de *R. sphaeroides* à la famille structurale IV. Pour cette famille, les gènes impliqués dans la synthèse des OPG n'étaient pas connus. Nous disposions donc avec *R. sphaeroides* d'une opportunité de les identifier. Une mutagenèse par insertion de transpon a permis d'isoler un mutant dans la substitution des OPG et par la suite d'établir une collaboration avec le laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire de l'université du Texas (USA) dirigé par Samuel Kaplan. Les données de séquences réalisées dans ce laboratoire nous ont offerts une grand avancée. En effet, ces données montraient la présence chez *R. sphaeroides* de deux systèmes similaires à ceux impliqués dans la synthèse des OPG et répartis sur les deux chromosomes. Il s'agit de gènes similaires à *mdoGH* sur le grand chromosome et d'un gène similaire à *ndvB* sur le petit chromosome. Les gènes *mdoGH* sont présents chez les Protéobactéries de la subdivision gamma et sont responsables de la synthèse des OPG de la famille I, tandis que *ndvB* est présent chez des Protéobactéries de la subdivision alpha et est impliqué dans la synthèse des OPG de la famille II. Ces deux loci ont donc été interrompus afin de déterminer leur rôle dans la synthèse des OPG de la famille IV chez *R. sphaeroides* (**article 2**). Nous avons ensuite analysé le mutant déficient dans la substitution des OPG par le succinyle et réalisé l'expression hétérologue des gènes identifiés dans différentes souches d'*E. coli* (**article 3**).

A DETERMINATION STRUCTURALE DES OPG PRODUITS PAR *R. sphaeroides* (RESUME DE L'ARTICLE 1).

Article 1 : *Osmoregulated periplasmic glucans of Rhodobacter sphaeroides.*
Talaga, P, Cogez, V., Wieruszkeski, J.-M., Bohin, A., Lippens, G., & Bohin, J.-P.
(soumis à European Journal of Biochemistry).

Cet article présente la détermination structurale des OPG chez *R. sphaeroides*. Ma participation à ce travail a essentiellement consisté à mettre en évidence la substitution des OPG par l'acétyle.

Les OPG ont été extraits de cellules en phase stationnaire après croissance dans un milieu de basse osmolarité (LOS) et purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire sur Bio-Gel-P4, qui exclut les polysaccharides de masse supérieure à 4000 Da et qui retient ceux dont la masse est comprise entre 1000 Da et 4000 Da. Le dosage des sucres en sortie de colonne montre une seule fraction retenue. Aucune fraction exclue pouvant correspondre aux LPS ou aux exopolysaccharides n'est observée. La quantité d'OPG produits à basse osmolarité chez *R. sphaeroides* est estimée à 29 µg/mg de protéines. Cette quantité est divisée par 6 lorsque l'osmolarité du milieu est augmentée par 0,4 M NaCl (5 µg/mg de protéines).

En utilisant une procédure similaire à celle ayant permis l'isolement du mutant *mdoC* chez *E. coli*, un mutant, NFB4000, dont les OPG présentent un défaut dans la substitution par les résidus de succinyle, a été isolé à partir de la souche WS8. Le crible a consisté à analyser par chromatographie sur couche mince les OPG extraits des clones issus d'une mutagenèse par insertion de Tn5TpMCS (voir article 3). Le mutant NFB4000 synthétise la même quantité d'OPG que la souche parentale à basse ou haute osmolarité.

L'analyse par chromatographie en phase gaz (GLC) des glucanes réduits après méthanolyse et silylation montre un contenu exclusivement composé d'unité de glucose et aucune extrémité réductrice. La fraction purifiée vérifie donc deux propriétés communes aux OPG : l'osmorégulation et la composition monosaccharidique comprenant uniquement du glucose.

L'analyse en spectrométrie de masse (Matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) Time of fly (TOF)), en mode positif montre de nombreux ions quasimolaires pour la souche WS8 (Fig 1A). Pour simplifier le spectre, un traitement alcalin, permettant d'éliminer les substituants fixés par une liaison ester, a été effectué sur ces OPG. L'analyse MALDI-TOF des OPG ainsi traités permet de mettre en évidence un nombre réduit d'ions $[M+Na]^+$ quasimolaires : un ion majoritaire dont la masse correspond à un glucane cyclique de DP18 et sept ions minoritaires correspondant à des glucanes cycliques de DP 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24 (Fig 1C). Le glucane produit est donc essentiellement homogène en taille.

L'analyse MALDI-TOF des OPG natifs du mutant NFB4000, isolé pour le caractère neutre de ses OPG, montre un spectre plus dépouillé que celui de la souche sauvage. Ce spectre met en évidence un incrément de masse de 42 par rapport aux masses des ions $[M+Na]^+$ correspondant aux glucanes de DP 16 à 19 (Fig 1B). Si les OPG de la souche NFB4000 sont préalablement traités à la soude, le spectre MALDI-TOF obtenu est identique à celui des OPGs traités à la soude de la souche sauvage (Fig 1D et 1C). Ces résultats indiquent la présence d'un substituant conférant un incrément de masse de 42 et labile à la soude, ce qui correspond à la fixation d'un résidu O-acétyle.

L'ensemble de ces informations permettent d'analyser plus facilement le spectre de masse des OPG natifs de la souche sauvage (Fig 1A). Si l'on compare ce spectre à celui des OPG du mutant NFB4000, on constate la présence d'un incrément de masse de 100 supplémentaire. Cet incrément disparaît après traitement à la soude et peut correspondre à une substitution par des résidus O-succinyle. Les masses obtenues sur ce spectre (tableau 1) montrent la présence de 0 à 7 résidus de succinyle et de 0 à 2 résidus d'acétyle.

L'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton des OPG de la souche sauvage montre la présence de signaux à $\delta = 2,6$ ppm et $\delta = 2,8$ ppm, ces deux signaux correspondent aux protons des deux groupements méthylènes des résidus O-succinyles ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) et confirment donc la présence de ce substituant sur les OPG produits par *R. sphaeroides* (Fig 2). Les signaux entre 4,3 ppm et 4,6 ppm sont attribués aux protons H-6 et H'-6, respectivement, des résidus de glucose liés en position C-6 par une liaison ester à un résidu de succinyle. Le signal correspondant aux protons du groupement méthyle des résidus O-acétyle n'est pas visible sur le spectre RMN des OPG de la souche sauvage. Par contre, il se détache bien du bruit de fond sur le spectre RMN du proton des OPG de la souche NFB4000 : $\delta = 2,2$ ppm (Fig 3). L'absence dans ce spectre de signaux aux déplacements chimiques 2,6 ppm et 2,8 ppm confirme l'absence de résidus succinyle sur les OPG du mutant NFB4000.

Pour permettre une analyse avancée du squelette glucanique une grande quantité du glucane de DP 18 cyclique a été préparé par Dionex (High-Performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)). Les glucanes ainsi purifiés ont été méthylés, méthanolysés et acétylés puis soumis à une analyse GLC-MS (Masse spectrometry). Cette analyse montre la présence de 3,4,6-méthyl Glc et de 2,3,4-méthyl Glc dans un rapport de 17,6:1. Le glucane purifié est donc cyclique, composé d'une liaison 1,6-glucosidique et de 17 liaisons 1,2-glucosidiques et ne présente pas de branches.

Le spectre RMN du proton à une dimension (Fig 4) montre le doublet des 18 protons anomériques (H-1) de chacun des 18 résidus de glucose et révèle ainsi la conformation rigide du glucane purifié. Les résidus de glucose sont distingués par une lettre de a à r en fonction du déplacement chimique du proton anomérique. Les constantes de couplage correspondant aux doublets des protons H-1 montrent une anomérie alpha pour le résidu de glucose a ($J_{1,2} = 3,3$ Hz) et une anomérie bêta pour les résidus de glucoses b à r ($J_{1,2} = 7,6$ Hz). Le spectre COSY permet d'assigner les H-2 de chaque résidu de glucose (Tableau 2). Il n'est pas possible d'assigner sans ambiguïté les autres signaux qui se chevauchent fortement.

L'analyse des spectres RMN hétéro-nucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (Fig 5) et HSQC-TOCSY (Fig 5 encadré) permettent d'assigner l'essentiel des déplacements chimiques des carbones de chaque résidu (tableau 3).

Les spectres RMN NOTO et TONO (Fig 6A et 6B) montrent la corrélation entre protons anomériques des résidus de glucose liés. Ce spectre permet d'établir trois groupes de liaison entre les résidus de glucose : a-r-k ; g-l-c-o-e-j ; et i-q-h-m-d-p-b-n-f. L'analyse du spectre RMN hétéro-nucléaire HSQC-NOESY (non présenté), permet de corrélérer les signaux du proton anomérique d'un résidu de glucose donné avec le signal du carbone du résidu de glucose voisin à travers la liaison glucosidique. Ainsi la corrélation aH-1/ iC-6 montre une liaison 1,6-glucosidique entre le Glc(a) et le Glc(i). Puisque aH-1 est d'anomérie alpha, l'unique liaison α 1,6-glucosidique se situe entre les résidus de glucose a et i. Tous les autres protons anomériques sont corrélés à des carbones C-2, confirmant ainsi les résultats de méthylation qui montraient 17 liaisons 1,2-glucosidique et une liaison 1,6-glucosidique. De plus, les corrélations fH-1/gC-2 et jH-1/kC-2 permettent de circulariser les groupes de liaison précédemment obtenus entre résidus de glucose et ainsi de résoudre la structure du glucane majoritaire : un glucane cyclique comportant 17 glucoses liés en β -1,2 et un glucose (a) lié en α -1,6 (Fig 7).

En conclusion, les OPG produits par *R. sphaeroides* sont des glucanes cycliques homogènes en taille (18 résidus de glucose) qui comportent des liaisons β -1,2 et une liaison α -1,6. Ces caractères rapprochent les OPG de *R. sphaeroides* de ceux produits par *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris*. Ainsi la famille IV définie sur des bases structurales rassemble des OPG qui sont synthétisés par des bactéries appartenant à trois subdivisions différentes des Protéobactéries (alpha, bêta et gamma). L'identification des gènes

impliqués dans la synthèse de la famille IV peut donc être envisagée par la recherche de mutants chez *R. sphaeroides*.

B LES GENES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DES OPG CHEZ *R. sphaeroides* (RESUME DE L'ARTICLE 2).

Article 2 : Osmoregulated Periplasmic Glucans production in *Rhodobacter sphaeroides* : Analysis of the structure and function of the *opg* locus. Puskas, A., Cogez, V., Gak, E., Bohin, J.-P., & Kaplan, S. (soumis à European Journal of Biochemistry).

Cet article présente l'identification des gènes impliqués dans la synthèse des OPG chez *R. sphaeroides*. Ma contribution à ce travail a consisté en l'analyse phénotypique de toutes les souches comportant une interruption des gènes similaires aux gènes connus pour être impliqués dans la synthèse des OPG. Cet article est sous la responsabilité d'Agnes Puskas et je n'en possède encore qu'une version préliminaire qui sera remaniée sur plusieurs points.

Le gène *ndvB* précédemment identifié sur le petit chromosome a été inactivé. Les OPG produits par la souche EG238, *ndvB*, ont été désubstitués par un traitement alcalin et analysés par spectrométrie de masse. Le spectre de masse de ce squelette glucanique sera ajouté à l'article. Celui-ci montre que la souche EG238 produit des OPG cycliques majoritairement de DP 18. D'autre part les analyses structurales des OPG ont été réalisées sur la souche sauvage WS8, par contre le mutant est issu de la souche sauvage 2.4.1 ; ce résultat confirme donc que la structure des OPG est identique quelle que soit la souche sauvage.

Dans un précédent article, Puskas (1997) décrit les gènes composant le capteur de quorum chez *R. sphaeroides*. Le cosmides pUI8166 portant ces gènes a été cartographiés sur le grand chromosome. Organisés en tandem, le gène *cerI* code l'enzyme de synthèse de l'autoinducteur (N-acyl(*cis*- $\Delta^{7,8}$ -14:1)-homosérine lactone), et le gène *cerR* code le facteur de transcription dont l'activité dépend de la concentration en autoinducteur. Afin d'identifier des gènes régulés par le capteur de quorum, la région en aval des gènes *cerRcerI*, a été séquencée. L'analyse des séquences montre quatre phases ouvertes de lecture : *orfY*, *opgG*, *opgI* (*orfX*), *opgH* (Fig 11).

Le début de la phase ouverte de lecture du gène *opgG* est situé 800 pb après le codon stop du gène *cerI*. La séquence polypeptidique prédite s'étend sur 509 acides aminés et présente 40 % d'identité et 58% de similitude avec la protéine MdoG d'*E.coli* dont la taille est comparable (511 acides aminés). Le programme d'analyse SOSUI prédit que la protéine OpgG est soluble ; il en est de même pour MdoG. Aucune de ces deux protéines ne contient un domaine protéique pouvant suggérer leur fonction.

La phase ouverte du gène *opgH* commence 203 pb après le codon stop du gène *opgG*. Le produit de ce gène présente 37% d'identité et 53% de similitude avec la protéine MdoH d'*E. coli*. Néanmoins, le gène *opgH* code une protéine de taille significativement plus courte (595 acides aminés contre 847 acides aminés pour la protéine MdoH). Il est possible de mettre en évidence entre les acides aminés 92 et 273 un domaine caractéristique des glycosyl-transférases. Les pourcentages de similitude et d'identité de cette région avec la protéine MdoH sont plus élevés : 39-40% et 68-70% respectivement. Le caractère fortement hydrophobe de la protéine OpgH indique une localisation membranaire. La protéine MdoH est également hydrophobe et intégrée à la membrane. La figure R-1 montre l'alignement multiple des protéines similaires à MdoH accessible dans les banques de données. L'algorithme de prédiction de segment transmembranaire disponible sur le site TopRed2 (<http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2>) prédit 7 hélices alpha aussi bien pour OpgH de *R. sphaeroides* que pour MdoH (régions indiquées par des croix soulignées (Fig R-1)). Mais Debarbieux et coll. (1997) ont prouvé expérimentalement l'existence de 8 segments transmembranaires dans la protéine MdoH (régions indiquées par des étoiles soulignées (Fig R-1)). L'organisation des protéines de type MdoH dans la membrane présente une large région cytoplasmique impliquée dans l'activité de polymérisation

Les données du génome de *Rhodobacter capsulatus* sont accessibles sur le site <http://rhodo1.uchicago.edu/capsulapedia>. La comparaison des locus *opg* entre *R. capsulatus* et *R. sphaeroides* montre la même organisation : deux gènes similaires aux gènes *mdoG* et *mdoH* séparés par une courte région intergénique. Les protéines OpgG des espèce de *Rhodobacter* présentent 59,9% d'identité et 73 % de similitude sur une région de 483 acides aminés. Les protéines OpgH présentent 68,9% d'identité et 76% de similitude sur une région de 541 acides aminés. Les régions intergéniques présentent des similitudes moins élevées.

Chez *R. sphaeroides*, la région intergénique de 320 pb entre *opgG* et *opgH* comprend une courte phase ouverte de lecture (correspondant à un peptide de 66 acides aminés), *opgI*, dont le codon d'initiation chevauche le codon stop du gène *opgG*. Cette séquence ne présente

```

vchH -----MTNPMVEQGAS
spuH* -----
xfaH -----MEMQIGASEVVQV
xciH -----
rpaH -----MDAVIAPRHEDCRD
paeH -----AGGDPALASVRARLQLGTPELDDAEMFGVDAQGRNFLKISPPIRRRTKVIPEP
psyH -----MLGVDASGRLLKATPPIRRRTKVVPEP
styH -----REDDSPQGSVKARLEHAWPDSLAKG-QLIKDDEGRDQLQAMPKATRSSMFPDP
senH -----REDDSPQGSVKARLEHAWPDSLAKG-QLIKDDEGRDQLQAMPKATRSSMFPDP
ecoH -----REDDSPQGSVKARLEQAWPDSLADG-QLIKDDEGRDQLKAMPEAKRSMFPDP
neuH -----REDDSPLGSVKARLEQSWPDSLVR-QLTEDDEGRDQLKAMPKATRSSISDPD
echH -----DGSVVTMQSPDDIPLVSVPRRLELAWEDGLNGGKQLGKDEGRDQLQAMPRI TRASMFPDA
ypsH RLACTGHQAHSVAGDPAEEDCALVSVKARLQAAWPEVLKGENVLGQDSEGRTVIHAVPPIKRTSMAFQA
rspH -----
rcaH -----

```

Figure R-1 : Comparaison des protéines de type MdoH. XXXX segments transmembranaires prédits par TopRed2 ***** segments transmembranaires démontrés expérimentalement (Debarbieux et coll., 1997). vch : *Vibrio cholerae*, spu : *Shewanella putrefaciens*, xfa : *Xilella fastidiosa*, xci : *Xanthomonas citris*, rpa : *Rhodopseudomonas palustris*, pae : *Pseudomonas aeruginosa*, psy : *P. synringae*, sty : *Samonella typhi*, sen : *Samonella enterica*, eco : *E. coli*, neu : *Nitrosomonas europaeae*, ech : *E. chrysanthemi*, yps : *Yersinia pseudotuberculosis*, rsp : *R. sphaeroides*, rca : *R. capsulatus*.

vchH QQTAGKANVY...FRKNIA...FAS...H...SG...DHL...V...D...D...S...Q...P...S...T...M...I...S...A...Q...R...M...Q...S...D...D...A...G...L...F...C
spuH* Q...THKHSRVY...P...FRKNVA...F...A...G...V...A...F...C...R...E...D...H...L...L...V...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
xfah ERLGAHDR...E...P...ADNAG...F...A...G...V...A...F...C...R...E...D...H...L...L...V...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
xciH DRVGGHGR...E...P...ADNA...F...A...G...V...A...F...C...R...E...D...H...L...L...V...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
rpaH ELAATHDR...L...Y...P...H...P...H...N...T...A...F...S...G...H...A...L...W...V...E...F...E...G...A...D...F...M...V...I...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
paeH RETKGF...K...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
psyH RETKGF...K...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
styH AAVQGE...Q...S...E...F...P...R...R...R...M...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
senH AAVQGE...Q...S...E...F...P...R...R...R...M...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
ecoH AAVQGE...Q...S...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
neuH AAVQDK...Q...S...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
echH REVGGAGR...I...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
ypsH RDVEGH...G...R...E...F...P...R...R...R...V...K...F...S...G...H...I...D...E...C...R...I...W...G...D...R...Y...M...V...M...D...A...D...S...L...E...S...S...T...I...T...G...A...Q...R...M...Q...A...D...E...D...A...G...L...F...C
rspH RERDAE...G...R...E...F...P...A...V...N...R...G...E...F...A...G...H...E...L...I...Q...K...S...A...I...P...F...A...V...I...E...D...A...D...S...L...E...G...E...T...I...V...D...M...R...R...L...A...E...P...R...L...G...L...L...C
rcaH AERNVA...G...R...E...F...P...E...L...N...T...G...K...N...A...G...H...E...L...I...T...I...T...S...G...A...N...D...Y...A...V...I...E...D...A...D...S...L...E...G...E...T...I...L...Q...M...I...R...R...L...A...E...P...R...L...G...L...L...C

vchH TIPALINGT...E...M...F...V...Q...F...A...R...I...N...G...E...V...V...G...T...E...A...W...V...Q...K...E...G...N...E...F...G...H...N...A...I...E...F...T...E...A...E...M...S...A...A...G...L...P...H...L...S...R...P...P...E...G...G...
spuH* TIPSLINGT...E...M...F...L...Q...F...A...R...I...N...G...E...V...I...G...T...E...G...W...V...Q...K...E...G...N...E...F...G...H...N...A...I...E...F...T...E...A...E...M...G...A...A...G...L...P...N...L...K...G...K...P...P...E...G...G...
xfah SLEVVVGG...R...E...F...P...M...O...F...G...A...C...V...A...G...I...I...A...Y...G...V...A...W...H...G...A...B...N...E...F...G...H...N...A...I...E...F...T...K...A...F...A...D...I...A...G...L...P...A...L...P...G...R...K...P...E...G...G...
xciH TLEPAVNG...Q...I...F...E...M...O...F...G...G...R...A...G...E...I...I...A...F...G...V...A...W...H...G...A...B...N...E...F...G...H...N...A...I...E...F...T...Q...A...F...A...D...I...A...G...L...P...S...L...R...G...R...K...P...E...G...G...
rpaH TLEVVVQAR...E...F...P...V...Q...F...A...R...I...N...G...E...V...V...G...T...E...A...W...V...Q...K...E...G...N...E...F...G...H...N...A...I...E...F...T...Q...A...F...A...D...I...A...G...L...P...T...L...A...G...R...K...P...E...G...G...
paeH TAPKASGMD...I...Y...F...R...M...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...M...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...G...K...G...S...F...A...G...
psyH TAPRASGMD...I...Y...F...R...M...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...M...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...G...K...G...A...F...A...G...
styH SSPKASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...V...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...E...G...G...S...F...A...G...
senH SSPKASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...V...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...E...G...G...S...F...A...G...
ecoH SSPKASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...V...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...E...G...G...S...F...A...G...
neuH SWPRASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...V...Q...P...E...I...E...G...T...L...A...L...P...E...G...G...T...E...A...G...
echH SAPRASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...V...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...E...G...G...S...F...A...G...
ypsH SAPKASGMD...I...Y...F...R...C...O...F...A...T...R...V...A...G...L...E...T...A...G...H...F...W...L...G...E...S...H...Y...G...H...N...A...I...E...F...R...F...K...P...E...I...E...G...A...L...A...P...L...P...E...G...G...S...F...A...G...
rspH TLEVVTKARAR...F...G...P...S...M...O...F...S...A...A...L...H...A...P...V...E...A...R...G...N...A...M...M...O...G...R...T...G...P...F...G...H...N...A...I...E...F...V...Q...A...E...A...E...S...G...L...P...E...L...S...C...P...P...P...E...G...G...
rcaH TLEKVI...R...A...R...S...R...F...G...P...A...M...O...F...A...S...F...F...S...V...E...A...R...G...N...A...M...M...O...G...R...T...G...P...F...G...H...N...A...I...E...F...V...T...R...A...E...A...E...S...G...L...P...A...L...K...G...K...P...P...E...G...G...

vchH SHLVEAAL...I...P...G...W...S...V...T...E...A...D...E...S...G...S...F...E...E...C...P...S...I...L...L...A...V...D...R...R...W...O...G...H...L...Q...H...S...I...I...G...T...G...L...W...I...S...F...L...H...
spuH* SHLVEAAL...I...P...G...W...S...V...L...A...Y...D...E...P...G...S...E...E...C...P...S...I...V...L...A...V...D...R...R...W...O...G...H...L...Q...H...S...I...L...P...T...G...L...W...I...S...F...L...H...
xfah HVLSHLVEAAL...I...P...G...G...W...A...T...H...M...V...P...Y...Q...G...S...E...E...G...P...T...T...L...L...I...R...D...R...W...O...G...H...L...Q...H...A...K...I...V...T...A...A...G...L...W...I...S...F...M...H...
xciH HVLSHLVEAAL...I...P...G...G...W...A...M...H...M...V...P...Y...Q...G...S...E...E...G...P...T...T...L...L...I...R...D...R...W...O...G...H...L...Q...H...A...K...V...V...G...A...G...L...W...I...S...F...M...H...
rpaH EMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...R...I...H...L...P...T...E...R...G...S...E...E...C...P...S...L...L...F...A...A...P...D...R...R...W...O...G...H...L...Q...H...G...K...L...L...T...A...R...G...L...W...I...S...F...L...H...
paeH AMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
psyH AMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
styH SMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
senH SMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
ecoH SMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
neuH SMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
echH SMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
ypsH AMLSHLVEAAL...M...E...P...G...W...G...W...I...Y...D...E...P...G...S...E...E...L...P...E...M...L...L...E...R...D...R...W...O...G...H...L...M...N...F...L...F...L...V...G...M...P...V...H...F...A...V...
rspH HVMSHLVEAAL...L...A...P...S...W...I...R...F...D...D...I...R...G...S...E...E...G...P...E...V...L...H...A...P...D...R...R...W...O...G...H...L...Q...H...G...I...L...F...A...P...L...G...C...W...N...F...F...
rcaH HVMSHLVEAAL...L...A...P...S...W...I...R...L...D...D...I...R...G...S...E...E...G...P...E...I...V...D...H...A...P...D...R...R...W...O...G...H...L...Q...H...S...I...I...G...A...P...L...R...L...W...S...F...F...

Figure R-1 (suite): Comparaison des protéines de type MdoH. XXXX segments transmembranaires prédits par TopRed2 ***** segments transmembranaires démontrés expérimentalement (Debarbieux et coll., 1997).

```

vchH  LTFEIMSSSFFLLLLILSGLLALQAHFIREETEQFSSTTVMDSARLQRYTIMGITSPRI
spuH*  LMGGIMASFFSFFLLLLILTGLMALQAHFIREETDQFSSTTVMDSARLRYTIMGITSPRI
xfaH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-MHFSPAHYHGRTDGDVLWITFMFVLLAPK
xciH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
rpaH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
paeH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
psyH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
styH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
senH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
ecoH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
neuH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
echH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
ypsH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
rspH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
rcaH  MFIIGHFTFMGLMLLVGIIPLVGDGIDLTAG-LFSPARYWHGSSQGNATWIEVCFMFLAPK
*****
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

```

vchH  FGLLLMFDEMCRTLGGRLRVILSAVTEILLSAVAPIMMLIHCGAVSILFGRDSCAPQRFIDGSLP
spuH*  FGVLLLKDKFARSVGGRIKAMFVIFEVILSAVAPIMMFIHCGAVMSILMGRDSCAPQRFIDGSM
xfaH  AYFALLFKPYERRACGGALVLLIIEESILAAAMPVYVYLSQSGFEVLACKDSDAQQFIDGKLS
xciH  GYIALLNPRELRACGGAFAAVSIIEETVLAAMAFVYVYLSQSGFEVLACKDSDAQQFIDGKLS
rpaH  ALFVLLRSDTRRRRFGGLTFGGVIEETMISAITAPMVVQSTAEIILGRDAGVQVHFIDGAI
paeH  SVMIIWAK--AKGFGGVIIVTISMLIEMFFSVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWSVQNSPQFIDATP
psyH  SVI IWAK--AKGFGGKFKVTVMLEMLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWAATNSPQFIDSTP
styH  SIM IWCK--TKEYGGFWVTLSLIEVLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWEVVNSPQFIDSTP
senH  SIM IWCK--TKEYGGFWVTLSLIEVLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWEVVNSPQFIDSTP
ecoH  SIL IWCK--TKEYGGFWVTLSLIEVLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWEVVNSPQFIDSTS
neuH  SIL IWCK--TKEYGGFIIVTISLIEVILVLLAPRMLIEVRFVLAAFGKVKVAKSPQFIDST
echH  SVI VCAK--AKSYGGVAKLFIIVVEMLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWSVQNSPQFIDATP
ypsH  SIV IWAK--AKAYGGASHLLIIMLEMLFVLLAPRMLIEVRFVLAAFGWSVQNSPQFIDATP
rspH  MIAIEAIVT--RAAGFGGAGVLVSTIAELVFSSIIAPILMAIQRSIQVLLGRDGGPTNNGIDGSL
rcaH  IATRMALTC--AAKFGGAALGFATSESLALSSITAPLLMYSRSIQVVMRDCGGPTNNGIDGTL
*
*****
XXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

```

vchH  IKDLLYRWRHMTAGVLLGYAAMLDSWTLEAAMSALIGWFWVPLGITASYTICAWFKOKRILAT
spuH*  IRLTIYRWRHMLAGVMLGYAAILDSTLEAAMSALIGWFAVPIAWTGSIKIEFFKIGILATE
xfaH  SVLLRSYGLSVLGLIGALAYTVSPPLAMMSFVVLGMAFVPLVALT HRLVAVLRWGIFFL
xciH  PALLRSYGLTVFLFMGAVAYAVSPALAAFMGEVIVGMAFIPVALTSLRRTMALRAGIFC
rpaH  LREVVRVYALPTAGTTMAIGAWLVSWPLIEMTEVIVGLAIPALLTTE---ASRSPLIMMTEQ
paeH  SEAIRRQMQLCIAWTLVAVLNPRFVWSESIVGSIIPVVISVVKLRLARDEKFFL
psyH  IEAVKRPQTLGACWALLVFWLNPSFVWFAIVVSMIPVVISVTKLVRARDEKFFL
styH  GEAFMSQLLGLVWAVGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
senH  GEAFMSQLLGLVWAVGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
ecoH  GEAFMSQLLGLVWAVGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
neuH  REAFMSQLLGLVWATGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
echH  SEAFMSQLLGLVWAGGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
ypsH  SEALVMSQLLGLVWAGGMAWLDLRFVFAIVFVSPVVISVSTVLRTKWKFFL
rspH  VAQAWSASHWIVTWELIGIGATYYFAPGLVLEVALPMIFPLIAVTEK-----RSIAFTMEL
rcaH  LKDSFAASHWIVTILVGLMTTWFFAPGLLEVGLPMVFPILLSWSE-----PSIRAMGVSE
*****
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

Figure R-1 (suite): Comparaison des protéines de type MdoH. XXXX segments transmembranaires prédits par TopRed2 ***** segments transmembranaires démontrés expérimentalement (Debarbieux et coll., 1997).

```

vchH      IETAIIVLAAQARRDEYVVDLQEVVWARMVLADHNLIALHIAMMDKLP SRQPGTAIEPLDAVARIKVQEA
spuH*    RNAPICI-----
xfaH     TAISKVIRVAELRRARQP-----
xciH     LDISKVIRVASELRRAAALE-----
rpaH     IDIAIAQVHALADRLCPANQTTDPLSALRGDRRLRELHLAALAFHPPRRRGRIDP-HLATARVLIDDA
paeH     YDTRERIRATDEYTYENRWHALKDGFLKAVDPLLNALACAMGTARHNRAQAIETVRGERIGKAIKDGPE
psyH     FEIQEPISTDRYTYENRWHALKQGFIREVVDPRQNALACALATSRHRQAQPIEVVVMERVDQALKVGP
styH     YSIPQVIVDTDKYLEMNRRLDDGFMHIVFNPSLNALATAMATARHRASKVLEIARDRHVEQALNETPE
senH     YSIPQVIVDTDKYLEMNRRLDDGFMHIVFNPSLNALATAMATARHRASKVLEIARDRHVEQALNETPE
ecoH     YSIPQVIVDTDRFLEMNRQRSLDDGFMHIVFNPSFNALATAMATARHRASKVLEIARDRHVEQALNETPE
neuH     YSIPKVIIVDTDNYLMMNRNRRLNDGFMHIVFHPSFNALTTATATARHRKSKVLEIARDHHEQALNEPPD
echH     SDIPREIVATDEYFRNRERKLDHGFMHIVFDPSINALTSAMATARHRFSRPIEDMREQRVNDALS RKPQ
ypsH     YDIPRIVLATEEYKLNHQRALSHGFIHIVMNPYNALVSAMATARHHSKAIIEQVRTQRTVPPPTAGPD
rspH     VALTPVLAHDAILADWERSPAPEAVPALAVSHA-----
rcaH     YAKIIVVVKLHDEVLNRWALDAETEQQDIPRQPKKELSAHHG-----

```

```

vchH      ESQESLLALITKVELSYVLGNPLLIQQVAKLPPSLANQTV-----
spuH*    -----
xfaH     -----
xciH     -----
rpaH     ESYSEAAGWIGPREIRAVLGDRETLQRLQLSGEHAQLAVGSEPSG-----
paeH     QLDGATRLAIVLSDPVALSRLHTRVWEEDRDDWLGRWRKAEADDPHAASVPLAQVVPGDAGLLPAAQS---
psyH     KLGNOERLIVLSDPVALGRLHERVWSEGHEEWLAAWRASIEADPHAPLLPLQPEGKASEPVPV-----
styH     KLNRRDRRLVIVLSDPVTMARLHYRVWNAPERYSSWVNHYSQSLVLPQALQGRVSSAG-----
senH     KLNRRDRRLVIVLSDPVTMARLHYRVWNAPERYSSW-----
ecoH     KLNRRDRRLVIVLSDPVTMARLHFRVWNSPERYSSWVSYEGIKLNPLALRKPDAASQ-----
neuH     KLNRRDRRLVIVLSDPVIMSRHLHYCVWAMPEKYASWVNHYSQSLVLPQALQGRVSSAG-----
echH     DVDCNLRRLAIVLSDPVTLARLHHRVWSQPDTHSDWRSHYQTLAAPVIKSAQ-----
ypsH     NLEKKQQLIIVLSDPVLSRLHQIQQPETYQRWNVYRQRAHNVGVFAAIEYQNQ-----
rspH     -----
rcaH     -----

```

```

vchH      -----
spuH*    -----
xfaH     -----
xciH     -----
rpaH     -----
paeH     -----
psyH     -----
styH     -----
senH     -----
ecoH     -----
neuH     ALPGTP
echH     -----
ypsH     -----
rspH     -----
rcaH     -----

```

Figure R-1 (suite): Comparaison des protéines de type MdoH. XXXX segments transmembranaires prédits par TopRed2 ********* segments transmembranaires démontrés expérimentalement (Debarbieux et coll., 1997).

aucune similitude avec les données des banques et un assez faible pourcentage de similitudes avec son homologue de 106 acides aminés chez *R. capitulatus* : 38.9% d'identité sur 54 acides aminés.

Enfin, en aval du gène *cerI*, après une région en tige et boucle (séquence répétée inversée) qui pourrait figurer un terminateur intrinsèque malgré l'absence d'une région polyA, et précédé d'une séquence Shine-Dalgarno, une phase ouverte de lecture s'étendant sur 273bp, *orfY*, est identifiée. Cependant la séquence peptidique prédite ne présente aucune similitude avec les données des banques.

Chacune des phases ouvertes de lecture identifiée a été interrompue par insertion de cassettes et report sur le chromosome. L'analyse des OPG produits par les mutants ainsi construits a été effectuée afin de déterminer l'implication des gènes, *orfY*, *opgG*, *opgI*, *opgH*, dans la synthèse de ces composés. La nature et la position des cassettes est montrée sur la figure 5 L'analyse du contenu en OPG des différents mutants est résumée dans le tableau II.

Les résultats montrent que l'interruption de l'une des phases ouvertes de lecture correspondant à *OpgG*, *OpgI* et *OpgH* conduit à un phénotype *Opg⁻*. Ces gènes sont donc fonctionnels, impliqués et essentiels à la synthèse des OPG. L'interruption de la phase ouverte de lecture *orfY* n'a pas de conséquence sur la synthèse des OPG. Celle-ci n'est donc pas impliquée dans cette voie métabolique.

L'inactivation du gène *opgG* par l'interposon oméga peut être complétée par le plasmide pNFR20 portant le gène *opgG* seul. Malgré les signaux de terminaison de transcription de la cassette, la mutation n'a pas d'effet polaire sur l'expression des gènes *opgI* et *opgH* en aval. Selon l'orientation de la cassette Kan^r dans le gène *opgI*, la mutation crée a un effet polaire ou non sur l'expression du gène *opgH*. En effet les plasmides pGAK245 et pGAK246, contenant le gène *opgI*, complètent la mutation non polaire (cassette Kan dans le même sens de transcription) de la souche EG13 mais ne complètent pas la mutation polaire (cassette Kan dans le sens inverse de transcription) de la souche EG13R. Ceci montre que les gènes *opgI* et *opgH* sont cotranscrits. Le plasmide pGAK135 contenant le gène *opgI* ne complète pas la mutation de la souche EG13, alors que les plasmides pGAK245 et pGAK246 qui contiennent une région, en amont, allant jusqu'au site *BamHI* permettent celle-ci. Puisque les plasmides pGAK245 et pGAK246 contiennent le même insert orienté différemment par rapport au promoteur Tet du plasmide, on peut en déduire que la région en aval du gène *opgI* contient un promoteur. Ceci explique l'effet non polaire de l'interruption d'*opgG* par l'interposon oméga sur l'expression des gènes *opgIH*. Le plasmide pGAK136

contenant *opgH* permet la complémentation des mutations *opgH::Kan^r* des souches EG18 et EG7. En conclusion, l'absence de terminateur entre *opgG* et *opgIH* permet d'envisager que la transcription initiée en amont d'*opgG* se poursuit à travers les gènes *opgIH*. Ainsi on peut envisager l'existence d'un opéron *opgGIH*. La présence d'un promoteur secondaire dans *opgG* est évidente chez *R. sphaeroides* et avait déjà été observé chez *E. coli* et *E. chrysanthemi* sur des plasmides à copies multiples. La mise en évidence de deux tailles de transcrite permettrait de prouver cette organisation.

Malgré la possibilité d'une cotranscription entre les gènes *opgG* et *orfY*, l'interruption de *orfY* n'a aucun effet sur la synthèse des OPG quelle que soit l'orientation de la cassette Kan^r. Le gène *orfY* n'intervient donc pas dans la synthèse des OPG. De plus, aucun promoteur ne peut être mis en évidence en amont d'*orfY*. Les séquences situées 143 pb avant le codon d'initiation du gène *opgG*, TTGGAA et TTGAAA séparées par 17 nucléotides, pourraient être les séquences -35 et -10 du promoteur de l'opéron *opgGIH*.

Les mutants *cerI* ne produisent plus d'autoinducteur et présentent un phénotype muqueux dû à l'augmentation de la synthèse des exopolysaccharides. Afin de déterminer si les gènes *opg* étaient impliqués dans ce phénotype, des doubles mutants *opgG*, *cerI* et *opgH*, *cerI* ont été construits. Ces doubles mutants gardent un phénotype muqueux. Les gènes *opg* ne sont donc pas impliqués dans l'apparition de ce phénotype.

C LE GENE IMPLIQUE DANS LA SUBSTITUTION DES OPG PAR LE SUCCINYLE CHEZ *R. sphaeroides*. (RESUME DE L'ARTICLE 3)

Article 3: The *opgC* and *opgGIH* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of Osmoregulated Periplasmic Glucanes. Cogez, V., Pukas A., Gak E., Kaplan S., & Bohin, J.-P. (en préparation).

Cet article présente l'analyse d'un mutant de *R. sphaeroides* déficient dans la substitution par le succinyle des OPG et l'expression hétérologue des gènes de *R. sphaeroides* chez *E. coli*. Le groupe de Samuel Kaplan a construit les souches EG7 et EG18, le cosmide pUI8166 et a déterminé sa séquence nucléotidique.

Une mutagenèse par insertion du Tn5TpMCS a été effectuée sur la souche sauvage WS8 de *R. sphaeroides* pour constituer une banque de 836 mutants potentiels. L'analyse par chromatographie sur couche mince des OPG produits par 436 clones a permis l'identification du mutant NFB4000. Les OPG produits par cette souche présentent en effet une migration moindre par rapport à la souche sauvage WS8 (Fig 1, dépôt 1).

La migration des OPG de la souche NFB4000 (Fig 1, dépôt 3) est similaire à celle des OPG d'une souche sauvage soumis à un traitement alcalin (Fig 1, dépôt 3). De plus, un traitement alcalin des OPG extrait de la souche NFB400 modifie modérément la migration de ceux-ci (Fig 1, dépôt 4). La saponification conduit à la perte des résidus de succinyle liés par une liaison ester. La mutation abolirait la substitution par ces résidus.

Le rendement et le taux de croissance, ainsi que le contenu cellulaire en OPG, sont identiques pour les deux souches cultivées à basse ou haute osmolarité. La perte de résidus de succinyle n'est donc pas la conséquence d'une diminution de la synthèse du squelette glucanique. Le gène interrompu a été dénommé *opgC* et la mutation *opgC1::Tn5TpMCS*.

Les OPG d'une souche sauvage portent jusqu'à 7 résidus de succinyle rendant les OPG fortement anioniques à pH 7,4. L'analyse par chromatographie d'échange d'anions (DEAE-Sephacel) des OPG extraits de la souche WS8 (Fig 2) montre la séparation de cinq sous-fractions (I, II, III, IV et V) éluées par des tampons de force ionique élevée, supérieure à 100 mM NaCl. Par contre, les OPG extraits de la souche NFB4000 ne sont pas retenus et sont élués dans le premier tampon de faible force ionique, démontrant la perte des résidus de succinyle. Les OPG produits par *R. sphaeroides* sont homogènes en taille, le DP majoritaire est de 18. On pourrait donc supposer que chaque sous-fraction correspond à un nombre de charges négatives définies, portées par les résidus de succinyle. Le pic II, bien séparé, et les pics III et IV, ont été dessalés et analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Cette analyse montre que chaque pic comprend des espèces de différents degrés de substitution par les résidus de succinyle. On peut donc en déduire que chaque pic correspond à un rapport masse sur charge dû à différents niveaux de substitution par les résidus de succinyle et d'acétyle sur un squelette de taille homogène.

La mutation *opgC1::Tn5TpMCS* a été clonée dans le plasmide pUC19 à partir de l'ADN génomique de la souche NFB4000 et en utilisant la résistance conférée par le transposon comme mode de sélection. La séquence d'une région flanquante en partant de l'IS50 et se poursuivant dans le gène *opgC* a été déterminée. La comparaison de cette séquence aux données de séquence en progrès du génome de *R. sphaeroides* (S. Kaplan,

communication personnelle) nous a permis de localiser le gène *opgC* dans le cosmide pUI8166 juste en aval de l'opéron *opgGIH*. Le cosmide pUI8166 qui contient une région chromosomique de 20kb incluant les gènes *cerIcerR*, *opgGIH* et des séquences en aval, introduit dans le mutant NFB4000 restaure la substitution des OPG par les résidus de succinyle.

Le plasmide pUI8166 a été sous-cloné dans pRK415. Le gène *opgC* est présent dans le fragment *SaII* de 4,5kb sur le plasmide pNFR13. Ce plasmide complémente également le défaut de substitution de la souche NFB4000.

Le transposon est inséré 747 nucléotides en aval d'un codon d'initiation ATG, lui-même situé 5 nucléotides avant le codon stop du gène *opgH*. La phase ouverte correspondante code une protéine de 399 acides aminés et se termine par un codon stop TGA. Le chevauchement des phases ouvertes de lecture suggère que le gène *opgC* fait partie de l'opéron *opgGIH*. Pour étayer cette hypothèse, nous avons testé l'effet polaire sur *opgC* d'une mutation dans *opgH*. La souche EG7 contient une cassette Kan^r orientée dans le sens inverse de la transcription de l'opéron *opgGIH*. Le plasmide pNFR21 (portant *opgGIH*) a été utilisé pour transformer la souche mutante. La mutation présente dans EG7 est complétement par pNFR21 puisque la bactérie produit des OPG. Cependant, l'analyse en chromatographie sur couche mince des OPG montre un profil équivalent aux OPG non succinylés de la souche *opgC1::Tn5TpMCS* (NFB4000). La mutation *opgH::Kan^r* de la souche EG7 a donc un effet polaire. Lorsque la cassette Kan est orientée dans le sens de la transcription, l'analyse des OPG d'une souche pNFR21/EG18 montre un profil de type sauvage (OPG succinylés). Ces résultats prouvent l'organisation en opéron des gènes *opgGIHC*.

Etant donné la forte similitude entre les protéines de *R. sphaeroides* et celles d'*E. coli*, 53% entre OpgH et MdoH, 58% entre OpgG et MdoG, nous avons essayé de complémente des mutants d'*E. coli mdoH* ou *mdoG* par le cosmide pUI8166. Dans ce cas, aucune complémentation n'est observée du fait certainement d'un défaut d'expression des gènes de *R. sphaeroides* chez *E. coli*. En effet, les séquences promotrices de l'opéron *opgGIHC* sont assez éloignées des séquences consensus reconnues par le facteur σ^{70} d'*E. coli* (Karls et coll., 1993). Les gènes *opgGIH* ont donc été fusionnés au promoteur de l'opéron lactose dans le plasmide pUC19. Cette construction ne permet pas non plus d'obtenir une complémentation. Puis nous avons utilisé le plasmide, pNFR2, obtenu lors du clonage de la mutation *opgC1::Tn5TpMCS*. Ce plasmide contient les gènes *opgIH* sous le contrôle du promoteur *lac*. Dans ces conditions, on observe une complémentation de la mutation *mdoH*.

Le plasmide pNF309 contient le gène *mdoH* sous le contrôle du promoteur *lac* dans le vecteur pYZ4. Afin de comparer la complémentation d'une mutation *mdoH* par la fusion *plac-opgIH* et *plac-mdoH*, nous avons construit le plasmide pNFR30. Le clonage a consisté en l'insertion d'un fragment de 4kb *EcoRI-HindIII*, rendu bout franc par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, dans le site *SmaI* du vecteur pYZ4. Pendant le crible des plasmides, il est apparu que certains plasmides, malgré l'orientation correcte du fragment par rapport au promoteur *plac*, ne permettent pas la complémentation de la mutation *mdoH*. Il semble donc nécessaire d'avoir une fusion traductionnelle entre *lacZ'* et *opgI* pour obtenir la complémentation comme pour le plasmide pNFR2. Nous avons ensuite analysé la complémentation d'une mutation *mdoH200::Tn10* dans la souche NFB216 par ces plasmides. La souche NFB4234 (contenant les gènes *opgIH* de *R. sphaeroides* sous le contrôle de *plac*) produit trois fois moins d'OPG que la souche NFB1100 (contenant le gène *mdoH* d'*E. coli* dans une construction comparable). Les OPG produits ont été entièrement désubstitués par un traitement à l'acide fluorhydrique suivi d'une neutralisation à l'hydroxyde de lithium et analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (Fig 4). Les résultats montrent que le degré de polymérisation (DP) des glucanes produits par la souche NF1100 s'étend de 5 à 11 résidus de glucose. Le spectre obtenu est assez similaire à celui des OPG d'une souche sauvage, à l'exception d'une abondance relative plus élevée pour les DP de plus grande taille. Par contre, le spectre de masse des OPG produits par la souche NFB4234 montre des glucanes de DP plus élevé allant jusqu'à 18 résidus de glucose. Cette observation peut s'expliquer par une processivité plus élevée de l'activité β -1,2-glucosyltransférase de l'enzyme OpgH, par rapport à celle de l'enzyme MdoH. Une autre hypothèse peut être une réduction de l'affinité entre OpgH et MdoG. La diminution de la quantité d'OPG extraits dans la souche NFB4234 favorise cette seconde hypothèse

Les OPG produits par la souche NFB1933, *mdoB*, *mdoC*, sont neutres comme le montre l'analyse par chromatographie d'échange d'anions (Fig 2, article 5). Nous avons utilisé cette souche pour tester la capacité de l'enzyme OpgC à catalyser le transfert de résidus de succinyle dans un contexte d'expression hétérologue chez *E. coli*. Les phases ouvertes de lecture des gènes *opgC* et *opgH* se chevauchant, un couplage traductionnel existe probablement entre ces gènes. Ainsi, pour obtenir l'expression du gène *opgC*, nous l'avons replacé en aval du gène *opgH* dans un plasmide permettant l'expression des gènes *opgIH* sous le contrôle du promoteur *lac*. La souche NFB1933, transformée par le plasmide pNFR37 ainsi construit, possède un contexte génétique permettant un radio-marquage spécifique des OPG

par incorporation de D-[U-¹⁴C]-Glucose. Le caractère anionique des OPG de la souche NFB4245 (pNFR37/NFB1933) a été analysé par chromatographie d'échange d'anions (DEAE-Sephacel, Fig5). Le profil d'éluion obtenu montre que 20% des OPG sont retenus par la colonne. Ces OPG anioniques sont répartis en proportion égale dans deux sous fractions éluées par une concentration croissante de NaCl. Ces résultats montrent que OpgC est exprimé et permet le transfert de résidus de succinyle sur les OPG d'*E. coli*. Néanmoins le taux de transfert est très faible.

La protéine OpgC (399 acides aminés) est fortement hydrophobe sur toute sa longueur. Le programme disponible sur le site TopRed2 prédit 10 segments transmembranaires. La protéine MdoC est l'OPG-succinyltransférase d'*E. coli*, sa séquence polypeptidique, comprenant 385 acides aminés, est également très hydrophobe sur toute sa longueur. Le programme disponible sur TopRed2 prédit pour MdoC 10 segments transmembranaires. A l'exception de ces points communs (taille similaire et caractère hydrophobe), il n'est pas possible de mettre en évidence des similitudes entre les séquences primaires des protéines homologues MdoC et OpgC.

La séquence en acides aminés déduite du gène *opgC* a été confrontée aux banques de données en utilisant le programme Blast2. Un score significatif a été obtenu avec une protéine de 431 acides aminés (ORF VC1941 AE004269) de *Vibrio cholerae*, la comparaison montre 37% de similitude sur 389 acides aminés. Douze segments transmembranaires sont prédits pour l'ORF VC1941 de *V. cholerae* et 10 segments transmembranaires sont prédits pour la protéine OpgC de *R. capsulatus*. Ces prédictions suggèrent que ces protéines sont toutes intégrées à la membrane cytoplasmique. La structure des OPG produits par *V. cholerae* n'est pas connue, mais il est possible d'identifier des gènes similaires aux gènes *mdoGH* dans les données du génome. Les OPG étant indispensables au pouvoir pathogène, il serait intéressant de déterminer la structure des OPG chez cette espèce. Dans le cas d'OPG succinylés, et si la perte de virulence est confirmée pour des souches Opg⁻ de *V. cholerae*, alors l'interruption du gène similaire à *opgC* permettrait de déterminer si celui-ci est impliqué dans la substitution des OPG par des résidus de succinyle et d'aborder le rôle des substituants. En conclusion, les gènes responsables de la substitution des OPG semblent peu conservés à travers les Protéobactéries.

D DISCUSSION.

1 La diversité des gènes impliqués dans la synthèse du squelette des OPG

Devant l'importante diversité structurale, on peut se poser la question du nombre de gènes, ou d'ensemble de gènes, nécessaires à la synthèse des squelettes glucaniques des OPG. Si les gènes sont aussi nombreux que les structures, il existerait alors au moins quatre systèmes correspondant aux quatre familles. L'alternative est qu'un système de gènes codant des glucosyltransférases ait pu évoluer pour modifier la spécificité des liaisons formées et permettre ces variations structurales. Au début de cette thèse, trois systèmes totalement dissemblables et impliqués dans la synthèse du squelette glucanique des familles I, II et III étaient identifiés. La première hypothèse semblait donc la plus juste.

Or les gènes impliqués dans la synthèse des OPG cycliques β -1,2 avec une liaison α -1,6 chez *R. sphaeroides* sont similaires aux gènes *mdoGH* d'*E. coli* qui sont impliqués dans la synthèse des OPG linéaires β -1,2 branchés par des résidus de glucose liés en β -1,6. Il semble donc que des gènes aient pu évoluer pour aboutir à la synthèse de squelettes glucaniques différents.

2 Mécanisme de biosynthèse

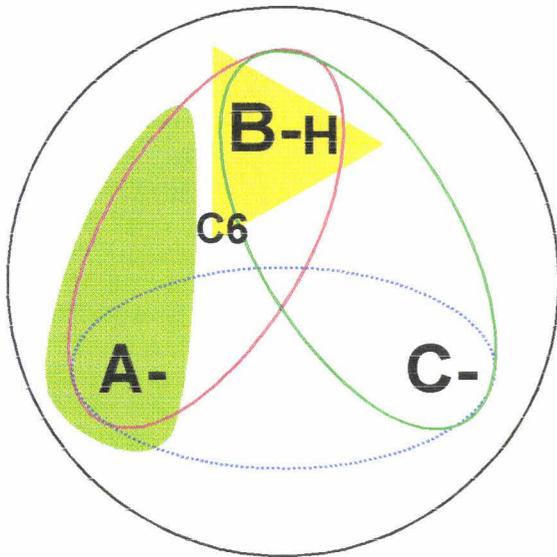
Le mécanisme supposé de biosynthèse des OPG linéaires branchés implique la polymérisation d'une chaîne de résidus de glucose par la partie cytoplasmique de la β -1,2-glucosyltransférase d'*E. coli*, MdoH. La chaîne naissante serait alors exportée vers le périplasma via le tunnel formé par les 8 segments transmembranaires de cette protéine. La formation des branches impliquerait alors la protéine MdoG. On peut donc imaginer, chez *R. sphaeroides*, que la protéine OpgH polymérise une chaîne de résidus de glucose liés en β -1,2 et que la protéine OpgG catalyse la formation de la liaison α -1,6 et de ce fait engendre la cyclisation de la molécule.

L'homologie fonctionnelle entre MdoH et OpgH est prouvée par la complémentation d'une mutation *mdoH* lors de l'expression hétérologue du gène *opgH*. Ces protéines sont toutes les deux intégrées à la membrane et présentent un domaine conservé de glycosyltransférase de la famille 2 (Carbohydrate-Active enZYmes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>). Cependant, la complémentation n'est que partielle. D'une part, la souche complémentée par *opgH* ne produit qu'un tiers d'OPG par rapport à une souche

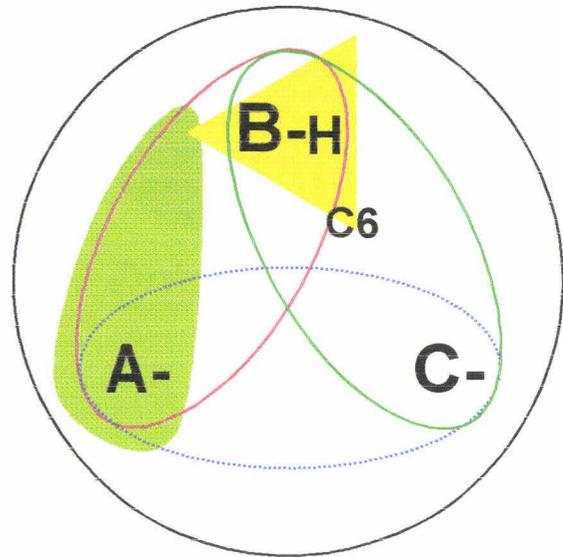
complémentée par *mdoH* et d'autre part les OPG sont de plus grande taille. Une perte relative du contrôle de la taille est également observée chez les mutants *mdoD* (Lequette, 1998). Le rôle de la protéine MdoD dans la biosynthèse des OPG n'est pas connu. Cependant, les OPG de plus grande taille produits par une souche *mdoH* complémentée par *opgH* pourraient révéler une interaction moindre des protéines MdoG et MdoD d'*E. coli* avec OpgH de *R. sphaeroides*. Une expérience envisageable pour étayer cette hypothèse est la construction de protéines hybrides entre MdoH et OpgH, suivie de l'analyse de la taille des OPG synthétisés. La région périplasmique supposée de la protéine OpgH comprise entre les segments transmembranaires 1 et 2 présente une délétion par rapport à MdoH et celle de taille non négligeable, comprise entre les segments 3 et 4, présente une conservation assez faible avec son homologue MdoH (Fig R-1).

Les figures R-2 à R-4 proposent un schéma réactionnel pouvant rendre compte de l'évolution de l'activité des protéines de type MdoG qui dans un cas conduisent à la synthèse d'OPG linéaires β -1,2 branchés en β -1,6 et dans un autre cas produisent des OPG cycliques β -1,2 avec une liaison α -1,6. Ce modèle repose sur plusieurs hypothèses. D'une part, l'extrémité réductrice est supposée activée par une liaison à la protéine de type MdoG, pour permettre, entre autre, la cyclisation du glucane ou les branchements. De ce fait, la polymérisation de la chaîne β -1,2 liée à la protéine de type MdoG s'effectuerait en continu à partir de l'extrémité non réductrice dans le cytoplasme. D'autre part, si l'on considère les mécanismes réactionnels d'hydrolyse ou de polymérisation de chaînes glycaniques les plus classiques (Saxena et coll, 1995 ; Carbohydrate-Active enZymes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>), ceux-ci sont de deux types : ils inversent ou conservent l'anométrie. Dans ce dernier cas, la réaction implique un intermédiaire enzyme-sucre et s'effectue en deux étapes. Si l'on suppose que la chaîne de glucane naissante est liée aux protéines de type MdoG, alors le mécanisme réactionnel est de type conservation d'anométrie. Dans le cas d'*E. coli*, l'hydrolyse de la liaison β -1,2 conduirait, en effet, à rebrancher un glucose par une liaison de type bêta. Par contre, chez *R. sphaeroides*, la liaison qui permet la cyclisation est de type alpha. Il semble donc qu'il y ait une étape supplémentaire dans ce dernier cas qui inverse l'anométrie. Le modèle postule ainsi que le site réactionnel des protéines de type MdoG implique trois acides aminés dont la chaîne latérale permettrait soit une attaque nucléophile (A- et C-) soit la cession d'un proton (B-H) (Fig R-2). Les chaînes latérales pourraient être des fonctions acides carboxyliques sous forme acide ou base conjuguée. Les résidus A- et BH forment le site I qui catalyse la rupture des liaisons β -1,2.

MdoG



OpgG



 site de reconnaissance des liaisons glucosidiques bêta-1,2

 site de reconnaissance des résidus de glucose et orientation de la position C6

site catalytique I = (A et B)

rupture des liaisons glucosidiques bêta-1,2
et branchement des glucoses en bêta-1,6

rupture des liaisons
glucosidiques bêta-1,2

site intermédiaire = (A et C)

déplacement de la chaîne
vers le site II

déplacement de la chaîne vers
le site II et inversion de l'anométrie

site catalytique II = (B et C)

hydrolyse et libération
de l'extrémité réductrice

cyclisation: branchement de
l'extrémité réductrice en alpha-1,6

Fig R2 : évolution des sites catalytiques supposés des protéines MdoG et OpgG

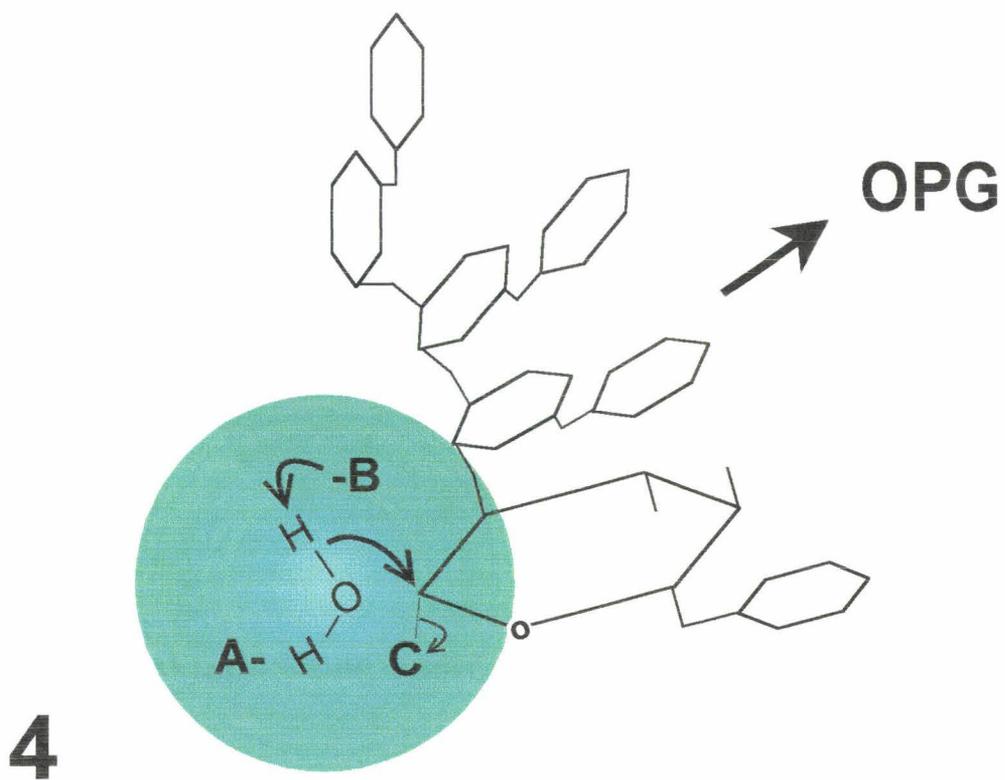
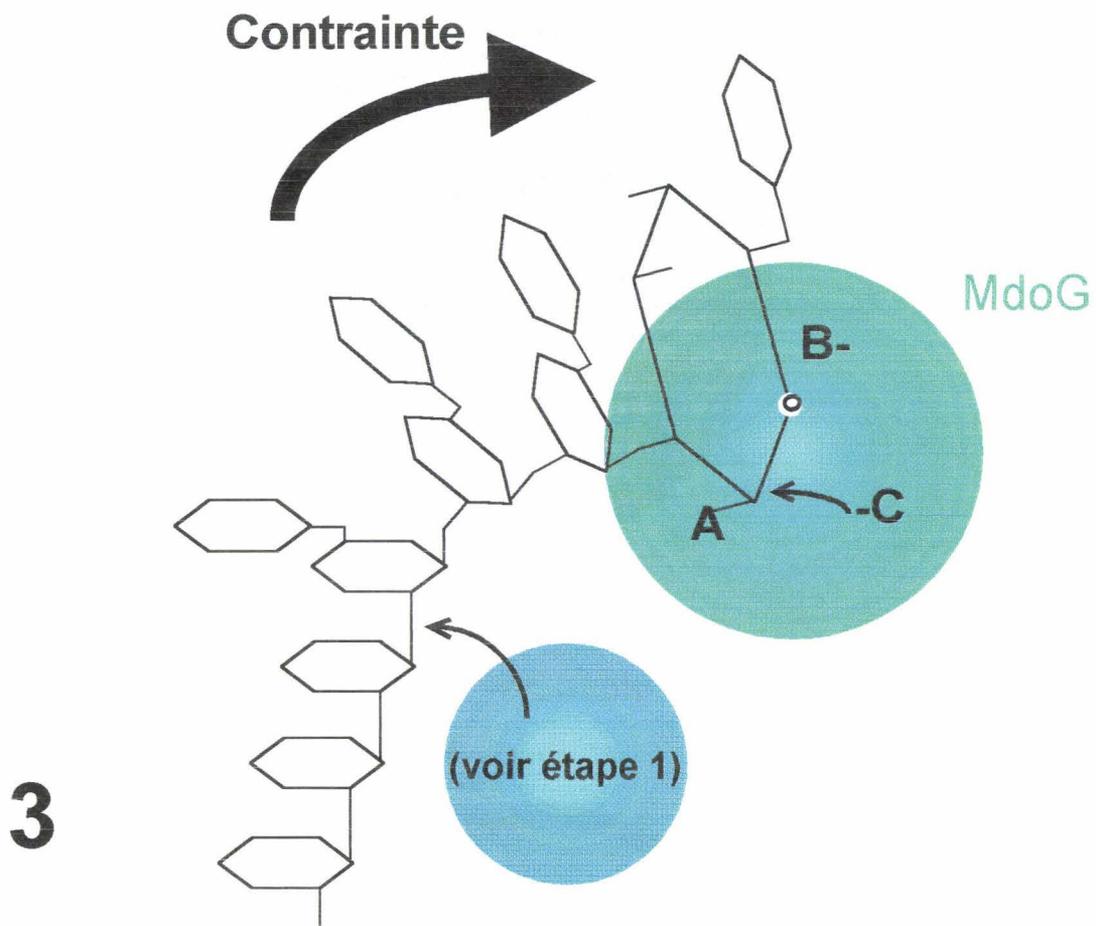


Figure R3 (suite): mécanisme réactionnel supposé de la protéine MdoG

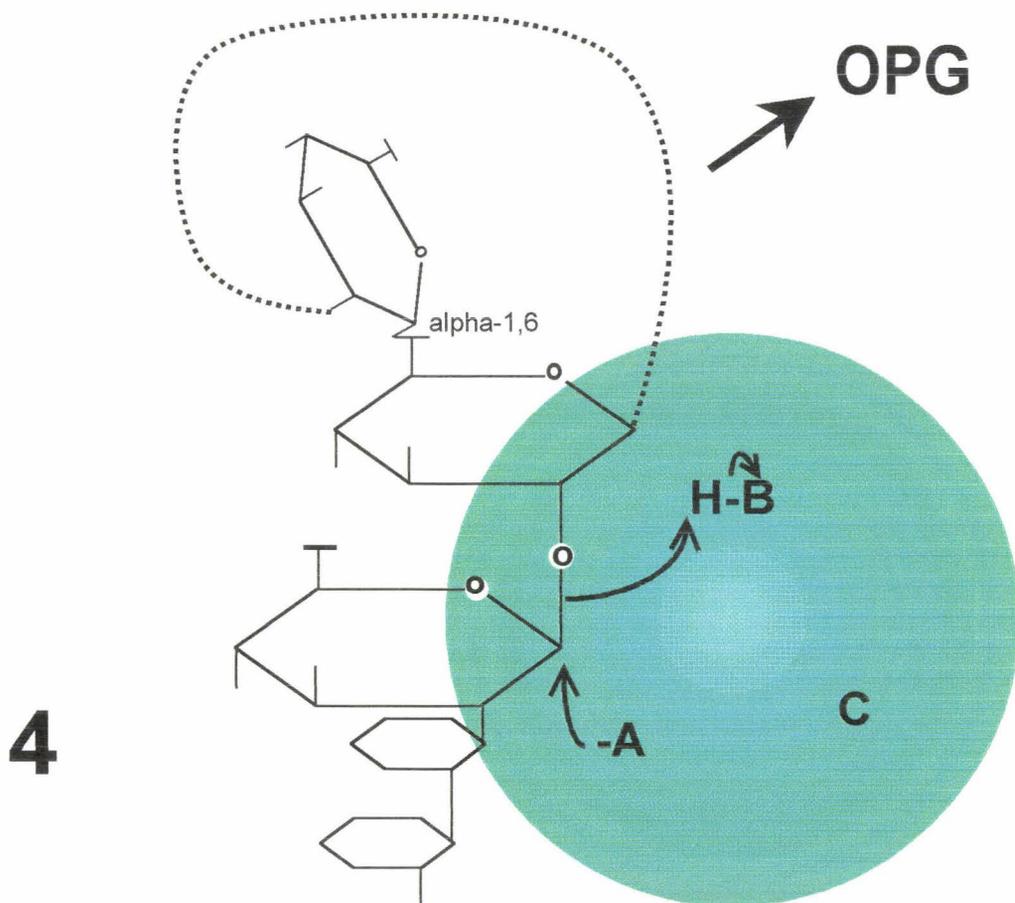
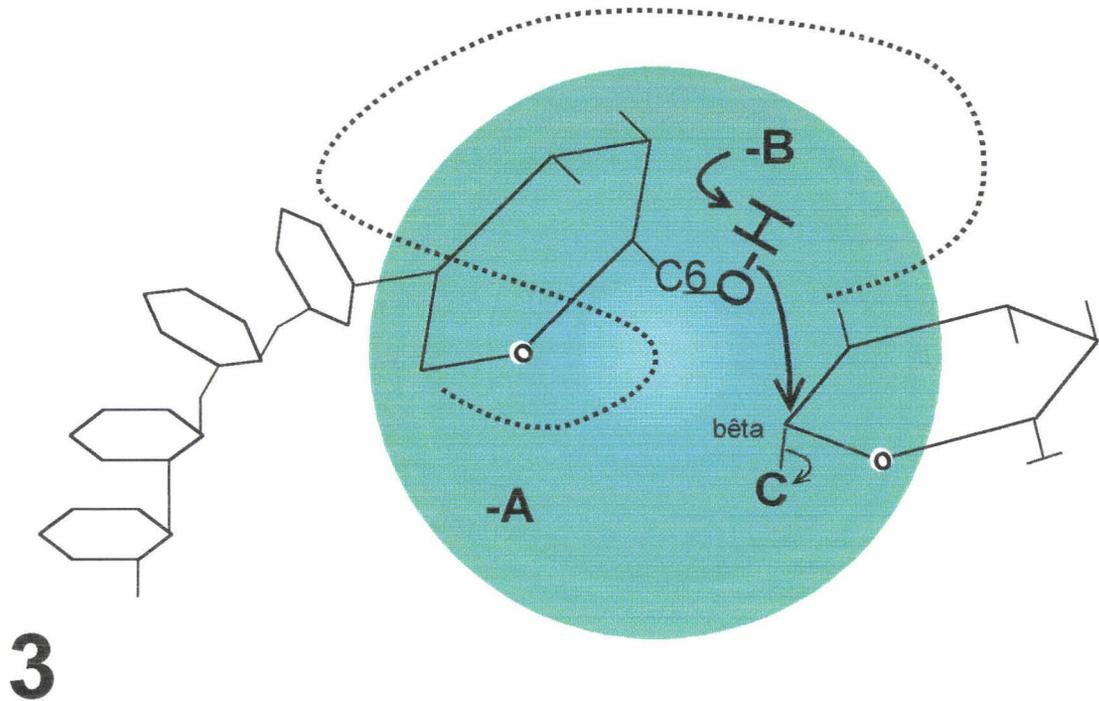


Figure R4 (suite) : mécanisme réactionnel supposé de la protéine OpgG

Dans le cas d'*E. coli*, la chaîne étant supposée fixée à une sous-unité MdoG, celle-ci présente la liaison glucosidique suivante à une sous-unité MdoG voisine. Ainsi la réaction de clivage permet de charger séquentiellement une unité de glucose sur plusieurs sous-unités MdoG (Fig R-3 étape 1). L'une des sous-unités MdoG garde la chaîne naissante puisque les autres sous-unités MdoG ont leur site I chargé d'un glucose. L'activité de branchement en β -1,6 des unités de glucose sur la chaîne naissante permet alors la libération des sites I (Fig R-3 étape 2). Les réactions de chargement d'unités de glucose puis le branchement de celles-ci se produiraient aléatoirement, la première réaction étant supposée dans un premier temps favorisée par rapport à la seconde. MdoH poursuit la polymérisation des résidus de glucose en β -1,2. La chaîne branchée naissante fixée sur le résidu A du site I subit alors des contraintes qui la rapproche du résidu C- du site II. La chaîne se déplace de A à C (Fig R-3 étape 3). Le site II, composé de C et de B-, catalyse une hydrolyse et effectue ainsi la libération de la chaîne du côté de l'extrémité réductrice (Fig R-3 étape 4). Le clivage d'une liaison β -1,2 à l'extrémité non réductrice comme dans l'étape 1 de la figure R3 libère le glucane et le système revient à son état initial, une unité MdoG étant toujours liée à la chaîne β -1,2 naissante. Dans le cas de *R. sphaeroides*, l'extrémité réductrice de la chaîne β -1,2 naissante est liée à une sous-unité OpgG en alpha sur le résidu A (Fig R4 étape 1). La chaîne s'allonge dans le périplasme grâce à la polymérisation et à la translocation effectuées par la protéine OpgH. Les contraintes subies par le système (OpgG-chaîne glucanique naissante) rapprochent du résidu C- le résidu de glucose de l'extrémité réductrice liée. Ce dernier effectue une attaque nucléophile sur le carbone 1 (Fig R-4 étape 2). La chaîne se déplace et se positionne dans le site II. L'extrémité réductrice est ainsi liée au résidu C sous une anomérie β (Fig R-4 étape 3). Puis le site II provoque la cyclisation de la molécule en catalysant la formation de la liaison α -1,6 (Fig R-4 étape 3). Dans ce cas, le proton subissant l'attaque nucléophile du résidu B- n'est pas issu d'une molécule d'eau mais un proton porté par le carbone 6 du 18^{ème} résidu de glucose. Enfin, le site I composé de BH et A- effectue alors la rupture de la liaison β -1,2 qui retient encore le cycle (Fig R-4 étape 4). Après la libération du glucane, le système se retrouve dans l'état initial (A lié à la chaîne glucanique, B-, C-). Ainsi, la diversité des squelettes glucaniques synthétisés par les protéines similaires, MdoG d'*E. coli* et OpgG de *R. sphaeroides*, reposerait sur l'orientation du site de reconnaissance et de positionnement du carbone C6 d'un résidu de glucose (Fig R-2). Les variations dans la séquence primaire en acides aminés auraient ainsi modifié légèrement les substrats des réactions catalysées par les sites actifs supposés (I ou II).

Actuellement, il n'est pas possible de mettre en évidence un site classique de glycosyltransférase en étudiant les protéines de type MdoG. Ceci est peut être dû au fait que les sites catalytiques sont formés par l'association de deux chaînes polypeptidiques de sous-unités MdoG voisines. Pour corroborer ce modèle, il faudrait, expérimentalement, déterminer les acides aminés impliqués dans la formation des sites catalytiques et montrer la formation d'un intermédiaire polyglucose-OpgG ou MdoG ainsi que l'existence d'un complexe multimérique, et enfin modéliser éventuellement les sites actifs dans l'espace pour vérifier leur faisabilité. Ces expériences sont en cours (production d'anticorps dirigés contre MdoG, recherche de mutants de la protéine MdoG). Dans ce processus de biosynthèse, le rôle de la protéine MdoD, et éventuellement son homologue chez *R. sphaeroides* OpgD, serait de contrôler la taille des chaînes ou des cycles en favorisant le passage au site réactionnel II des protéines MdoG ou OpgG.

En l'état actuel de nos connaissances, plusieurs modèles peuvent être envisagés. La présentation de celui-ci tente uniquement de montrer que des activités équivalentes peuvent aboutir à la synthèse d'un squelette glucanique soit de la famille I soit de la famille IV. Plusieurs questions restent en suspens : quel est l'accepteur β -glucoside *in vivo* à partir duquel MdoH effectue la polymérisation ? Si MdoG joue ce rôle, comment le mécanisme est-il amorcé ? Y a-t-il une perte d'unité de glucose au départ ? Ou la protéine de type MdoG est-elle glucosylée ou s'autoglucosyle-t-elle via un résidu de glucose activé sur le feuillet externe de la membrane cytoplasmique ? Quel est le rôle de l'ACP ?

3 Fonction du gène *opgI* dans la biosynthèse

A partir des données expérimentales présentées, il est difficile de déterminer si le produit du gène *opgI* est nécessaire au mécanisme de biosynthèse des OPG cycliques chez *R. sphaeroides* ou si cette région est nécessaire à l'expression du gène *opgH*. Puisque le mutant EG13 qui contient une mutation non polaire dans *opgI* ne synthétise plus d'OPG, on peut imaginer, dans un premier temps, que le produit du gène *opgI* est nécessaire à la synthèse des OPG. En effet, dans ce cas *opgH* serait exprimé sous le contrôle du promoteur de la cassette de résistance à la kanamycine. Cependant, le plasmide pGAK135 qui contient *opgI* sous le contrôle du promoteur de la résistance à la tétracycline ne permet pas de compléter une mutation non polaire dans *opgI* (EG13). Ce même promoteur est fonctionnel puisqu'il permet l'expression du gène *opgH*. En effet, le plasmide pGAK136 complètent les mutations *opgH* des souches EG7 et EG18. La complémentation de la mutation non polaire du gène *opgI* est réalisée par les plasmides pGAK245 et pGAK246 qui portent le gène *opgI* sous le

contrôle du promoteur secondaire. Les souches mutantes, dans lesquelles les plasmides sont introduits, ne présentent pas de mutation excluant un phénomène de recombinaison homologue. Il se peut donc que les complémentations observées soient dues à un événement de recombinaison remplaçant le gène *opgH* sous le promoteur secondaire. Cependant, il faut remarquer que ces événements auraient lieu dans des régions assez courtes (777 pb dans le cas de pGAK245 et pGAK246 et 467 pb dans le cas de pGAK136). De plus, ces événements n'auraient pas eu lieu dans le cas où les plasmides pGAK245 et pGAK246 sont introduits dans la souche EG7 qui porte une mutation polaire dans *opgI*. En conclusion, ces résultats semblent plus en faveur d'une fonction du gène *opgI* dans la biosynthèse des OPG.

La mutation *mdoH* chez *E. coli* peut être complétée par l'expression hétérologue du gène *opgH* de *R. sphaeroides*. Cependant, cette complémentation nécessite une fusion traductionnelle *lacZ'*-*opgI*. Deux explications sont donc possibles : soit OpgI est impliquée dans l'activité de polymérisation de la protéine OpgH, soit OpgH est exprimée uniquement dans le cas d'un couplage traductionnel. Pour lever cette ambiguïté, il faudrait exprimer OpgH seul puis éventuellement, à l'aide de deux fusions traductionnelles séparées, OpgI et OpgH.

On peut remarquer que la protéine OpgH est plus courte que son homologue MdoH (595 acides aminés contre 847). La région N-terminale des protéines de type MdoH est assez peu conservée. Chez *R. sphaeroides*, cette région de la protéine OpgH est plus courte de 74 acides aminés par rapport à MdoH. La protéine OpgI pourrait ainsi assurer la fonction de cette partie cytoplasmique. Une autre hypothèse pourrait être qu'OpgI assure la fonction jouée par l'ACP. En effet, Tang et coll. (1997) ont constaté que l'ACP produit par *R. sphaeroides* n'était pas actif dans les réactions, *in vitro*, de polymérisation de résidus de glucose en β -1,2 associées aux membranes d'*E. coli*. De plus, l'ACP de *R. sphaeroides* a un faible effet inhibiteur sur cette activité. On peut donc imaginer que l'ACP (69 aa) chez *R. sphaeroides* n'est pas impliqué dans la synthèse des OPG. Au cours de l'évolution, le rôle anciennement assuré par l'ACP a été remplacé par celui de la protéine de 66 acides aminés, OpgI, tandis que l'ACP aurait perdu cette activité.

4 Organisation des génomes de *R. sphaeroides* et *R. capsulatus*

Puskas et coll. espéraient découvrir des gènes régulés par le capteur de quorum au voisinage des gènes *cerRcerI*. Or, les résultats préliminaires obtenus ne montrent pas de relation entre les gènes *opgGIHC* et le capteur de quorum. *R. sphaeroides* et *R. capsulatus* sont des espèces proches phylogénétiquement. Les locus *cerRcerI* et *opgGIHC* ne sont pas au

voisinage l'un de l'autre chez *R. capsulatus*. Ceux-ci sont séparés par plus de 500 kb. L'organisation au voisinage des locus *cerRcerI* ne présente aucun point commun entre ces espèces. Ceci semble indiquer qu'il n'y a pas de pression de sélection maintenant des gènes régulés par capteur de quorum à son voisinage.

Un gène paralogue à *opgG* est mis en évidence chez *R. capsulatus* : *opgD*. Il est donc possible qu'un gène homologue soit présent chez *R. sphaeroides*. Il serait intéressant de le cloner et de l'inactiver pour déterminer si celui-ci joue également un rôle dans la synthèse des OPG comme c'est le cas pour *mdoD* chez *E. coli*. On peut se demander si l'inactivation de ce gène conduirait à la perte de contrôle de la taille des OPG de la famille IV chez laquelle celle-ci est très homogène.

Il est intéressant de remarquer que le génome de *R. capsulatus* ne comprend qu'un chromosome circulaire et qu'aucun gène similaire à *ndvB* n'est identifié dans celui-ci. Jumas-Bilak et coll. (1998a) ont montré que la présence de chromosomes multiples chez les protéobactéries de la subdivision alpha ne suit pas l'arbre phylogénétique. D'une part, ils constatent que certaines espèces de la subdivision alpha-2 ne présentent qu'un chromosome. De plus ils mentionnent que le genre *Rhodobacter* qui appartient à la subdivision alpha-3 peut inclure des espèces aux génomes complexes (*R. sphaeroides*) ou simples (*R. capsulatus*). Enfin chez une même espèce, *Brucella suis*, plusieurs organisations sont mises en évidence selon le biovar : le biovar 3 contient un chromosome de 3,2 Mb ; le biovar 1 deux chromosomes de 2,1 et 1,15 Mb et les biovars 2 et 4 deux chromosomes de 1,85 et 1,35 Mb (Jumas-Bilak et coll., 1998b). Deux hypothèses peuvent être formulées. La première suppose la duplication de région en tandem suivie d'une recombinaison des séquences répétées. Si chaque partie contient une origine de réplication ceci donne naissance à deux replicons stables. Ce type de remaniement semble se produire naturellement dans le genre *Brucella* aux niveaux des locus *rrn* (Jumas-Bilak et coll., 1998b). La deuxième hypothèse est celle d'un transfert horizontal d'une origine de réplication provenant d'un autre organisme. En conclusion, les auteurs, Jumas-Bilak et coll., constatant que les génomes complexes ne suivent pas clairement la phylogénie mais semblent plutôt acquis indépendamment, spéculent que l'apparition de génome complexe est favorisée par la structure ou le fonctionnement des génomes des protéobactéries de la subdivision alpha.

Schaeffer et coll. ont initié en 1976 l'étude de l'expression des gènes suite à la fusion de deux protoplastes de génotypes distincts chez *Bacillus subtilis*. Ces études ont été poursuivies et ont conduit à la mise en évidence de souches diploïdes non complémentantes

(Ncd) exprimant l'un des deux chromosomes parentaux. L'étude de la transmission des caractères au fur et à mesure des générations montre que l'inactivation est réversible (Grandjean, 1996 et 1998).

Chez *R. sphaeroides*, plusieurs gènes sont dupliqués sur les deux chromosomes. Cependant les voies métaboliques semblent réparties sur les deux chromosomes plutôt que dupliquées. Par exemple, les gènes *hemA* et *hemT* codent deux isoformes de l'acide 5-aminolevulinique synthase. Ces gènes sont localisés respectivement sur le chromosome CI et le chromosome CII. Le gène *hemA* s'exprime dans toutes les conditions standards testées tandis que le gène *hemT* n'est pas transcrit (Zeilstra-Ryalls, 1996). Il est possible d'activer l'expression du gène *hemT* par des mutations en *cis*- et en *trans*- (Zeilstra-Ryalls, 1995 et 1996). On ne peut donc pas totalement exclure que ce gène puisse s'exprimer dans certaines conditions. La présence des deux chromosomes peut-elle être la résultante d'un phénomène équivalent à la fusion de protoplastes. Dans ce cas l'inactivation n'aurait pas eu lieu sur l'ensemble d'un chromosome mais sur des voies ou des gènes de biosynthèse redondante sur l'un ou l'autre des chromosomes. De plus, la taille des chromosomes (CI 3 Mb et CII 0,9 Mb) semblerait indiquer une perte d'information. Le transfert d'informations horizontal le plus courant s'effectue par conjugaison. Ce processus permet la mobilisation de plasmide de grande taille. Il est également possible de mobiliser le chromosome par le facteur F chez *E. coli*. Dans ce cas la conjugaison conduit à la recombinaison homologue et non à des diploïdes. On peut imaginer qu'un processus rare du même type fasse intervenir deux espèces bactériennes et conduise à l'apparition chez l'un des partenaires d'un réplicon supplémentaire. L'analyse des génomes bactériens devrait très certainement apporter de nombreuses réponses sur l'origine des génomes complexes répartis sur plusieurs chromosomes circulaires ou linéaires.

Le gène *ndvB* n'est pas impliqué dans la voie de biosynthèse des OPG. On peut se demander : si ce gène s'exprime dans les conditions de croissance standard ? Ou dans des conditions particulières ? Dans quelle voie métabolique est-il impliqué ? Ce gène est-il fonctionnel ? Pour répondre à cette dernière question il est possible d'introduire ce gène chez un mutant *ndvB* de *S. meliloti* et de déterminer si les phénotypes sauvages sont restaurés, puis de déterminer la structure des glucanes produits. Le gène *ndvB* pourrait ne pas s'exprimer et représenter une réserve d'information pour des évolutions potentielles.

Il a précédemment été mis en évidence chez *A. brasilens* un gène *cviB* permettant la complémentation d'une mutation *chvB* chez *A. tumefaciens*. La phase ouverte de ce gène ne

comprend que 480 acides aminés et présente 60% de similitude avec la région N-terminale de la protéine NdvB de *S. meliloti*. Le promoteur permet l'expression d'une fusion transcriptionnelle avec *lacZ*. Cependant il est fort étonnant qu'un gène similaire à *ndvB* qui code une β -1,2 glucosyltransférase soit présent chez une bactérie qui synthétise des OPG cycliques β -1,3, β -1,6 branchés. Il serait intéressant d'inactiver le gène *cviB* et d'évaluer les conséquences sur le squelette glucanique. Pour la synthèse du squelette glucanique, on peut s'attendre à retrouver des gènes similaires aux gènes de *B. japonicum*. Il est possible que *cviB* code une activité de branchement. Mais il est alors étonnant d'obtenir une complémentation d'une mutation *chvB*. On peut remarquer que les espèces du genre *Azospirillum* possèdent plusieurs réplicons (Martin-Dodinet, 2000), tandis que le génome de *B. japonicum* ne comprend qu'un chromosome. De plus, la présence du gène *ndvB* semble limitée aux génomes des protéobactéries de la subdivision alpha (Tableau I-1).

Récemment, Nereng et Kaplan (1999) ont utilisés les gènes *hemA* et *hemT* pour analyser la complexité du génome de plusieurs souches de *R. sphaeroides*, ainsi que les gènes *rbcL* et *rbcR* respectivement localisés sur CI et CII. Cette étude montre que les gènes *hemA* et *rbcL* sont présents chez toutes les souches alors que l'un des gènes *hemT* ou *rbcR* est absent dans six souches sur 23. Les études présentées ne permettent pas de dire avec certitude que toutes les souches de *R. sphaeroides* possèdent deux chromosomes mais ces résultats montrent la complexité et l'hétérogénéité du génome chez cette espèce.

PARTIE II : RELATIONS ENTRE STRUCTURE ET FONCTIONS DES OPG DE LA FAMILLE I

Aucune fonction précise n'a pu être attribuée, à ce jour, aux OPG. *E. coli* constitue un bon modèle pour analyser les mécanismes de biosynthèse et de régulation. Ces études sont facilitées par l'analyse génétique et la détermination rapide du caractère $\text{Opg}^+/\text{Opg}^-$ par radio-marquage spécifique des OPG. Cependant, les mutants Opg^- d'*E. coli* n'ont pas de phénotype marqué. Chez *E. chrysanthemi*, les plasmides se maintiennent très difficilement et l'expression des gènes clonés n'est que transitoire. En revanche, les mutants Opg^- d'*E. chrysanthemi* sont caractérisés par un phénotype pléiotrope : hypersensibilité aux sels biliaires, motilité et chimiotactisme réduits, phénotype mucoïde des colonies, sécrétion et synthèse d'exo-enzymes réduites, non virulence vis-à-vis des plantes hôtes. Il apparaît donc qu'*E. chrysanthemi* constitue un bon modèle d'étude de la fonction des OPG.

Dans le but d'étudier les relations structure-fonctions, la détermination structurale des OPG chez *E. chrysanthemi* a été effectuée (article 4). Puis notre stratégie a été de modifier cette structure, soit par le biais d'expression hétérologue, soit par l'identification et l'interruption des gènes impliqués dans la substitution, et ainsi de définir la conséquence des modifications structurales sur les différents phénotypes.

Enfin la mise en évidence de la fonction des OPG peut être abordée par la recherche de mutations suppressives. Les phénotypes des souches Opg^- chez *E. chrysanthemi* procurent un mode de sélection simple de souches Opg^- ayant acquis une mutation suppressive, restaurant totalement ou partiellement, les phénotypes d'une souche sauvage. L'identification des gènes suppresseurs permettrait alors de définir le défaut conféré par l'absence d'OPG ou de révéler des interactions entre ceux-ci et d'autres constituants de l'enveloppe.

A CHARACTERISATION DES OPG D'*Erwinia chrysanthemi* (RESUME DE L'ARTICLE 4).

Article 4 : Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J., & Bohin, J.-P. (accepté pour publication dans Journal of Bacteriology)

Cet article présente la détermination structurale des OPG chez *E. chrysanthemi*. Ma participation à ce travail a consisté en l'étude de la localisation et de la substitution des OPG.

Les OPG produits par *E. chrysanthemi* ont été extraits des cellules et séparés par chromatographie de filtration sur Bio-Gel P4. Le profil d'éluion montre deux pics, le deuxième pic correspond aux sucres retenus et contient les OPG (Fig 1). Ceci est confirmé par l'étude de l'osmorégulation, la détermination de la composition monosaccharidique et la localisation périplasmique. En effet, la quantité de glucide dosé dans ce pic est de $76 \pm 5 \mu\text{g}$ équivalent glucose / mg de protéines lorsque les cellules sont cultivées à basse osmolarité (LOS) et diminue à $7 \pm 3 \mu\text{g}$ d'équivalent glucose / mg de protéine si les cellules sont cultivées dans le même milieu additionné de 0,3M NaCl. L'analyse en phase gazeuse de ce pic après méthanolyse, N-acétylation et triméthylsilylation montre qu'il est composé uniquement d'unités de glucose. De plus, si une réduction est réalisée au préalable, les résultats montrent un glucitol pour 6,7 glucoses, caractérisant un glucane non cyclique composé en moyenne de 7,7 glucoses.

La sécrétion d'OPG dans le milieu est observée chez certaines espèces de Rhizobiacée. Ceux-ci peuvent jouer un rôle dans les interactions plante-bactérie (Bhagwat et coll., 1999 ; Breedveld et Miller, 1994). Cette sécrétion varie selon les espèces et les souches et dépend des conditions et de la phase de croissance. Nous avons donc déterminé s'il était possible, dans certaines conditions, de trouver des OPG dans le milieu. En phase stationnaire de croissance, nous avons dosé 75% des OPG dans le milieu de culture. Sur les 25% restant, 80% sont libérés par un traitement à l'EDTA qui est connu pour libérer le contenu périplasmique. Un résultat similaire est obtenu lorsque les cellules sont séparées par filtration.

L'analyse par chromatographie d'échange d'anions des OPG extraits à partir de cellules cultivées soit à basse osmolarité (LOS) soit à haute osmolarité (LOS + 0,3M NaCl) montre que le caractère acide des OPG n'est présent qu'à haute osmolarité (Fig 2). Une analyse par chromatographie sur couche mince de chacune des fractions traitées ou non par la soude

montre la présence de deux substituants liés par des liaisons O-ester (voir la partie B2d). Les substituants connus, liés par une liaison ester au OPG, sont le succinyle (ou son isomère le méthylmalonyle) et l'acétyle. Nous avons mesuré, à l'aide de kits commerciaux de dosage, le contenu en acide succinique et en acide acétique des OPG après traitement à la soude et produits à basse ou à haute osmolarité. Le contenu en acide acétique ne varie pas en fonction de l'osmolarité du milieu : 6,1 µg/mg d'OPG (en équivalent Glc). Par contre le contenu en acide succinique est en dessous du seuil de détection à basse osmolarité et atteint 28,5 µg/mg d'OPG (en équivalent Glc).

L'étude par RMN du proton des OPG produits à haute osmolarité (Fig 3) met en évidence la présence de triplets correspondant aux protons des groupements méthylènes des résidus de succinyle. Les pics à 5,4 ppm (proton H-1) montrent l'anométrie alpha du résidu de glucose de l'extrémité réductrice. Les pics aux environs de 4,9 et 4,55 ppm révèlent les H-1 des glucoses engagés dans une liaison β -1,2 et β -1,6 respectivement. Les pics à 4,5 ppm correspondent au déplacement chimique des H-6 des glucoses liés par une liaison β -1,6.

Les OPG ont été traités à la soude pour permettre l'analyse du squelette glucanique. Une étude en phase gazeuse des produits de méthylation (méthylation, méthanolyse, peracétylation) des glucanes confirment la présence de liaisons 1,2-glucosidique et 1,6-glucosidique et montre la présence de point de branchement (Glc lié en position 2 et 6) (Tableau 1). La fréquence des branches est de 1 pour deux résidus de Glc.

L'analyse par RMN du carbone (Fig 4A) met en évidence l'anométrie bêta des liaisons par la détection de pics à 104 ppm (correspondant au C-1). De plus, les signaux analysés montrent la présence de liaisons β -1,2 et β -1,6, ainsi que des positions de Glc 2 et 6 non engagées dans une liaison, et confirment la présence d'une extrémité réductrice en conformation α et β . Les spectres correspondants des OPG produits par *Pseudomonas syringae* et *E. chrysanthemi* sont très semblables (Fig 4B et 4A). En conclusion, le squelette glucanique est formé d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 branchée par des unités de glucose en β -1,6.

L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des OPG produits à basse osmolarité confirme la présence d'une substitution par l'acétyle (incrément de masse de 42) et montre un degré de polymérisation variant de 6 à 11, avec une majorité de DP8 (Fig 5).

L'analyse du squelette glucanique par chromatographie Dionex (HPAEC-PAD) indique une hétérogénéité supérieure à celle mise en évidence par la spectrométrie de masse

(Fig 6). Pour expliquer ce phénomène les pics ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI (Tableau 2 et Fig 7) et soumis à une analyse par chromatographie en phase gaz (Tableau 3). Les résultats permettent de conclure que deux pics séparés en Dionex (HPAEC-PAD) peuvent avoir un même degré de polymérisation et ne différer que par leur taux de branchement. Cependant, les spectres de RMN du proton des différentes fractions séparées sur HPAEC-PAD, restent complexes et montrent que ces fractions sont composées d'un mélange de glucanes linéaires β -1,2 avec des branches β -1,6 liées de manière aléatoire.

B L'OPG-SUCCINYLTRANSFERASE D'*E. coli* ET RECHERCHE DE SON HOMOLOGUE CHEZ *E. chrysanthemi*.

1 L'OPG-succinyltransférase d'*E. coli* (résumé de l'ARTICLE 5)

Article 5 : The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. Lacroix, J.-M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A., & Bohin, J.-P. (1999) J Bacteriol, 181:3626-31.

Cet article présente l'identification du gène codant la succinyltransférase des OPG chez *E. coli*. Ma participation a été de préciser la structure du plasmide pNF239 et de confirmer la fonctionnalité de la phase ouverte de lecture définie pour *mdoC*.

Une mutagenèse par insertion de Tn5 a été effectuée sur la souche NFB732 dont les OPG sont dépourvus de phosphoglycérol et dont le caractère acide n'est conféré que par la présence des résidus de succinyle. Puisqu'il est possible de voir une différence de migration en chromatographie sur couche mince entre les OPG natifs ou désuccinylés par un traitement alcalin ; cette analyse chromatographique a été utilisée pour cribler 995 clones.

La souche NFB1864 ainsi isolée produit des OPG dont la migration n'est pas modifiée par un traitement alcalin et migre de la même façon que les OPG saponifiés de la souche parentale (Fig 1). Le contenu en acide succinique des OPG a été dosé; ceux produits par NFB732 contiennent 35 μ g/mg d'OPG, par contre il n'est pas possible d'en doser à partir des OPG de la souche NFB1864. Le contenu cellulaire en OPG pour ces deux souches est

similaire, il est donc exclu que la perte des résidus de succinyle soit dû à une réduction de la synthèse du squelette glucanique. La mutation conférée par l'insertion du Tn5 a été transférée dans un contexte *mdoB* par transduction généralisée, les clones Kan^r sélectionnés produisent des OPG dont le même profil de migration en chromatographie sur couche mince est identique à celui des OPG de la souche NFB1864. L'interruption provoquée par le transposon est donc responsable du phénotype OPG déficients en résidus de succinyle. Le gène interrompu a été dénommé *mdoC*.

La souche DF214 (*pgi*, *zwf*) permet un radiomarquage spécifique des OPG, des souches dérivées ont été construites : NFB734 (*mdoB*); NFB1919 (*mdoC*), NFB1933 (*mdoC*, *mdoB*). Ces souches produisent la même quantité d'OPG en condition de croissance à basse osmolarité (milieu LOS) et une augmentation de l'osmolarité par 0,3M NaCl réduit la production d'OPG d'un facteur 6 à 7 pour toutes les souches. Le caractère anionique ou neutre des OPG radiomarqués est évalué par chromatographie d'échange d'anions (Fig2). Le profil d'élution des OPG produits par la souche DF214 (*mdo*⁺, Fig2) montre cinq pics (I à V). Le pic I contient les OPG neutres ; les pics II à V sont élués par une augmentation de la force ionique et correspondent aux fractions d'OPG chargés négativement. Si les OPG étaient homogènes en taille, on pourrait conclure que les pic II, III, IV, et V correspondent respectivement à une différence de charge :-1,-2,-3,-4. Or les OPG sont hétérogènes en taille (6 à 12 résidus de glucose) et donc l'élution dépend du rapport masse sur charge. Le profil d'élution des OPG de la souche NFB734 (*mdoB*, Fig2) montrent que 80% des OPG sont présents dans le pic II et 10% dans le pic I. Celui de la souche NFB1933 (*mdoB mdoC*, Fig 2) montre que 90% des OPG sont retrouvés dans le pic I et sont donc neutres. Ces observations confirment le rôle du gène *mdoC* dans la substitution des OPG par les résidus de succinyle. Le profil d'élution des OPG de la souche NFB1919 (*mdoC*, Fig2) montre une augmentation du pic II et une diminution du pic IV ce qui peut être interprété comme une diminution du rapport masse sur charge imputable à l'absence des résidus de succinyle. L'augmentation de la fraction neutre (pic I) pour les souches portant une mutation *mdoB* ou *mdoC* prouve qu'une partie des OPG ne porte qu'un seul substituant anionique. Cependant la diminution de charge n'est pas aussi forte qu'on pourrait l'attendre et montre une compensation partielle par l'augmentation du taux de fixation du substituant anionique restant. La nature du pic V est obscure et correspond vraisemblablement à une contamination par d'autre composés.

La mutation *mdoC1::Tn5* a été clonée dans pUC8 à partir de l'ADN génomique et sélection des clones recombinants à l'aide de Kanamycine (le transposon confère la résistance

à cet antibiotique). A partir de l'IS50 une région se poursuivant dans le gène *mdoC* a été séquencée et confrontée aux banques de données. Le gène *mdoC* correspond au gène annoté et non attribué b1047 juste en amont de l'opéron *mdoGH*. Le plasmide pNF239, clonant l'opéron *mdoGH* et précédemment décrit, contient également le gène *mdoC* en entier (Fig 3). La carte de restriction de ce plasmide diverge de celle déduite des données de séquence du génome au niveau de l'extrémité gauche de l'insert. Pour lever cette ambiguïté, le fragment *PstI**-*SspI* a été séquencé, les données de séquences de cette région montre qu'elle provient d'un vecteur ColE1 utilisé lors des clonages ultérieurs.

Le Tn5 est intégré 377 nucléotides après un codon d'initiation ATG. La phase ouverte de lecture code une protéine de 385 acides aminés et se termine par un codon stop TAA. Cinquante cinq nucléotides après celui-ci se trouve un terminateur intrinsèque. La fonctionnalité de la phase ouverte a été vérifiée par la construction d'une fusion traductionnelle *lacZ*-*mdoC* dans le vecteur pUC19. Cette fusion commence 27 nucléotides après le codon d'initiation du gène *mdoC* et est portée par le plasmide pNF563. La souche NFB1447 (pNF563/NFB1864) produit des OPG anioniques. Si la fusion est interrompue par l'insertion de 4 nucléotides au site *HindIII* du multi-site de clonage, le plasmide construit (pNF564) n'est plus capable de compléter la mutation *mdoC1::Tn5*; NF1447 (pNF564/NFB1864) produit en effet des OPG neutres.

Les données récentes du génome de *Salmonella typhi* montre une forte conservation des gènes *mdoC* (82%), *mdoG* (94%) et *mdoH* (95%). La distance entre le début des phases ouvertes de lecture de l'opéron *mdoGH* et du gène *mdoC* est de 393 nucléotides chez *E. coli* et de 273 chez *S. typhi*. Ces régions intergéniques présentent 82% d'identité à l'exception d'une délétion de 120 nucléotides chez *S. typhi*. Un promoteur putatif est identifié 170 nucléotides devant le codon d'initiation du gène *mdoC*, il est formé par les régions -35 et -10 séparées par 16 nucléotides. Les promoteurs des gènes *mdoC* et *mdoGH* sont séparés par 102 nucléotides et pourraient donc être co-régulés.

La protéine MdoC (385 aa) est fortement hydrophobe, 10 segments transmembranaires sont prédits par l'algorithme accessible sur le site TopRed2 (<http://www.biokemi.su.se/server/topred2/>). La protéine ExoH code également une succinyltransférase de 370 acides aminés impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides et dont l'activité est essentielle à l'induction de nodules fixateurs d'azote par *Sinorhizobium meliloti*. Cette protéine est également très hydrophobe et possède 7 à 11 segments

transmembranaires sont prédits. Malgré ces points communs, aucune similitude de séquence n'est mise en évidence entre les protéines ExoH et MdoC.

La séquence en acides aminés déduite du gène *mdoC* a été confrontée aux banques de données via le logiciel Blast2. Une protéine bactérienne, Noll, présente des similitudes avec MdoC. Le gène *noll* détermine la spécificité d'hôte et code une acétyltransférase de 373 acides aminés impliquée dans la synthèse du facteur Nod indispensable à la nodulation chez *Mesorhizobium loti*. Le degré de similitude, entre les protéines MdoC et Noll, déterminé avec le programme LALIGN, est de 24,2% sur 149 acides aminés sans insertion dans l'alignement à l'exception de 3 résidus. Cette région s'étend des acides aminés 45 à 192 pour MdoC et des acides aminés 53 à 201 pour Noll. La protéine Noll est hydrophobe et 9 segments transmembranaires sont prédits. Ainsi les protéines MdoC, NodH et Noll sont probablement toutes des protéines intégrées dans la membrane cytoplasmique.

L'origine des résidus de succinyle reste inconnue mais on peut présager qu'ils proviennent du pool de succinyl-Coenzyme A. Les résidus de phosphoglycérol, provenant des phospholipides, sont transférés sur les OPG dans le périplasme. On peut ainsi imaginer qu'il en est de même pour les autres substituants. Ainsi la protéine MdoC associée à la membrane pourrait catalyser le transfert des résidus de succinyle du côté cytoplasmique de la membrane vers le squelette en cours de synthèse du côté périplasmique de la membrane.

En conclusion, le gène *mdoC*, très fortement lié à l'opéron codant les protéines nécessaires à la synthèse du squelette glucanique des OPG, code une protéine intégrée dans la membrane cytoplasmique nécessaire à la substitution de ce squelette. L'organisation de ces gènes permettrait une régulation génétique commune qui reste à élucider.

2 Recherche de la succinyltransférase d'*E. chrysanthemi*

Dans deux cas, le gène codant l'OPG-succinyltransférase est donc localisé à proximité immédiate des gènes de biosynthèse du squelette glucanique. Chez *E. coli*, *mdoC* est situé en amont du locus *mdoGH* et est transcrit de façon divergente. Dans le cas de *R. sphaeroides*, *opgC* est situé à la suite du gène *opgH* et fait partie de l'opéron *opgGHC*. Les gènes impliqués dans la synthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* sont similaires aux gènes *mdoGH* et la présence de résidus de succinyle sur les OPG a été mise en évidence. Le gène codant la succinyltransférase a donc été recherché au voisinage immédiat par séquençage des régions adjacentes (Page, 1998). Aucune similitude avec *mdoC* n'a été identifiée. La présence en

amont de l'opéron *opgGH* d'une séquence répétée directe peut constituer la cicatrice d'un réarrangement chromosomique provoqué par un élément transposable.

a Recherche par clonage *in vivo* au voisinage de *opgGH*

Néanmoins la possibilité que le gène *opgC* d'*E. chrysanthemi* soit à proximité moins immédiate a également été testée par clonage de régions avoisinant *opgGH* sur des R'. Pour sélectionner les R' ayant acquis des régions voisines des gènes *opgGH*, la résistance à la kanamycine associée à la mutation *opgH::uidA-Kan^r* a été utilisée. Ainsi le plasmide conjugatif R110 portant un phage Mu a été introduit par conjugaison dans la souche NFB3501. Les plasmides R' recombinants ayant acquis les régions chromosomiques avoisinant *opgH* sont sélectionnés par conjugaison dans la souche HB101. Les clones R'/HB101 sont réunis. L'efficacité du clonage *in vivo* est évaluée par la faculté des R' obtenus de compléter une mutation non polaire *mdoG::neo* d'*E. coli*. L'efficacité est assez faible puisque 60% des souches *mdoG::neo* ayant acquis un R' produisent des OPG. La souche NFB1953, *mdoB*, *mdoC*, *recA::Cml^r* a été construite pour permettre la contre-sélection de la souche donatrice lors du transfert des R' par conjugaison. Sur les 50 clones R'/NFB1953, dont les OPG ont été analysés par chromatographie sur couche mince, aucun ne produit des OPG succinylés montrant l'absence de complémentation. Le gène *opgC* ne semble donc pas se situer à proximité de l'opéron *opgGH*.

b PCR avec amorces dégénérées

Constatant le pourcentage élevé d'identité entre les produits des gènes impliqués dans la synthèse du squelette chez *E. coli* et *E. chrysanthemi* (MdoG/OpgG 75,5% 386/511; MdoH/OpgH 74,7% 625/829), nous avons supposé qu'il pouvait en être de même pour le gène codant l'OPG-succinyltransférase. Sur la base de cette hypothèse, des PCR avec des amorces dégénérées ont été réalisées sur l'ADN génomique de la souche sauvage EC3937. La définition des régions potentiellement conservées entre les OPG-succinyltransférases se basait alors sur un nombre limité de séquences connues : MdoC d'*E. coli* et son homologue potentiel chez *Salmonella typhi*. Les zones non conservées entre ces protéines sont exclues. Des zones plus restreintes ont été définies soit en prenant en considération de faible similitude avec OpgC, soit en privilégiant des zones regroupant des acides aminés pour lesquels le code génétique est peu dégénéré. Quatre courtes séquences d'acides aminés ont été définies dans la séquence de la protéine MdoC (Fig R-5) et ont servies à définir les amorces dégénérées. La dégénérescence a été réduite en considérant l'usage des codons chez *E. chrysanthemi*. Ainsi quatre couples d'amorces ont été utilisés pour réaliser des PCR classiques (à la température d'hybridation estimée), à basse température ou en température décroissante. Les produits de

PCR étaient de faible intensité et n'avaient pas la taille des fragments obtenus sur l'ADN génomique d'*E. coli*. Les bandes les plus intenses ont été clonées, séquencées et soumises aux banques de données. Aucune similitude n'a permis d'indiquer l'amplification d'un fragment de gène impliqué dans la substitution des OPG par des résidus de succinyle. Par exemple, les amorces FRMQVFFsens et DAWMYETantisens ont permis l'amplification d'un fragment qui présente de fortes similitudes avec le gène *metA* d'*E. coli*. Ce gène code l'homosérine transsuccinylase dont l'un des substrats est le succinyl-CoA.

c Mutagenèse par insertion de Tn5-B21 et crible des clones par analyse des OPG sur chromatographie sur couche mince.

Une nouvelle approche a donc été envisagée pour identifier la succinyltransférase d'*E. chrysanthemi*. Pour *E. coli* et *R. sphaeroides*, le crible d'une banque de mutants par insertion de transposon (à l'aide de l'analyse par chromatographie sur couche mince des OPG produits) a permis assez rapidement l'isolement d'un mutant dont les OPG sont dépourvus de résidus de succinyle (214^{ème} clone pour *E. coli* et 387^{ème} clone pour *R. sphaeroides*). Au moment de mettre au point le crible seuls les résidus de succinyle étaient décrits sur les OPG d'*E. chrysanthemi* et la présence de résidus de succinyle sur les OPG extraits à basse osmolarité était visible en analyse de spectrométrie de masse. Le système de chromatographie sur couche mince couramment utilisé pour les OPG ne permet pas de faire une distinction nette entre les OPG natifs et les OPG désuccinylés. La composition du solvant de migration a donc été modifiée : isopropanol/ethanol/eau 5/5/4. Dans ce système, le profil de migration des OPG d'*E. chrysanthemi* produits à basse osmolarité révèle trois tâches (Fig R-6). La tâche supérieure, qui disparaît après traitement à la soude, a été associée à la fraction succinylée des OPG. Sur cette base, 750 clones issus d'une mutagenèse par insertion de Tn5-B21 ont été analysés en chromatographie sur couche mince, aucun clone ne produisait d'OPG dont le profil de migration soit modifié.

d Existence d'un substituant non soupçonné sur les OPG d'*E. chrysanthemi*.

La poursuite des analyses structurales, en chromatographie d'échange d'anions, révèle que les OPG produits à basse osmolarité ne sont pas chargés (Article 4, Fig 2). L'analyse en chromatographie sur couche mince des fractions neutres des OPG extraits à basse ou haute osmolarité montre trois tâches (Fig R-6, A1 et B1). Si ces fractions sont soumises à un traitement alcalin, la tâche supérieure disparaît (Fig R-6 A2 et B2). Ces résultats indiquent la présence d'un substituant non chargé lié par une liaison ester au OPG. Des analyses complémentaires montrent qu'il s'agit de résidus d'acétyle (voir article 4). La tâche supérieure

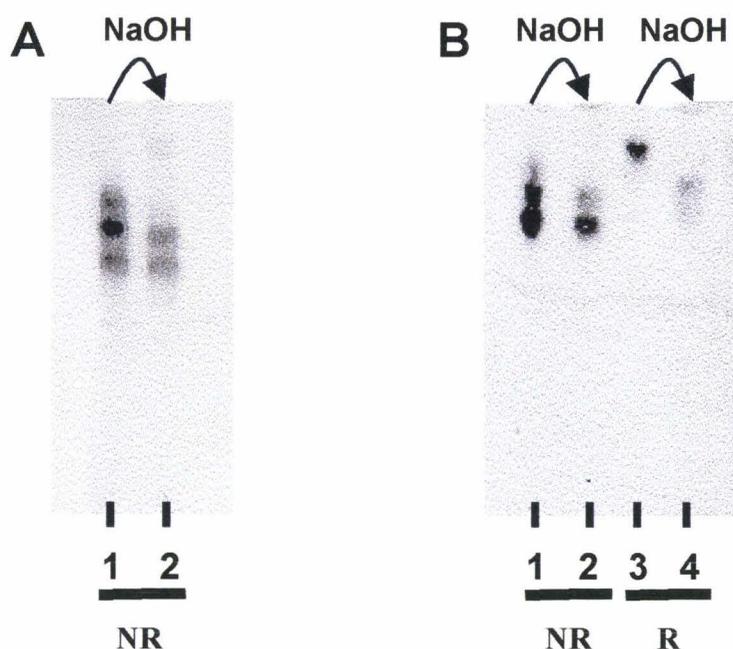


Fig R-6 : Chromatographie sur couche mince des OPG d'*E. chrysanthemi* extraits de culture à basse osmolarité (LOS) (A) ou à haute osmolarité (LOS + 0,3 M NaCl) (B) après séparation sur chromatographie échangeuse d'anions d'une fraction neutre (NR : non retenue) et d'une fraction anionique (R : retenue) (voir DEAE-Sepacel Fig 2 de l'article 4). Les dépôts 1 et 3 correspondent aux fractions (natives), neutres ou anioniques respectivement; les dépôts 2 et 4 correspondent aux fractions, neutres ou anioniques respectivement, après un traitement alcalin.

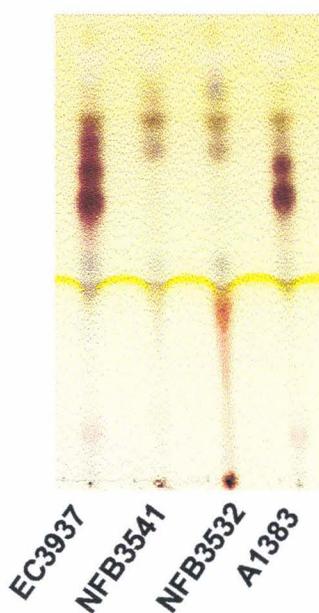


Fig R-7 : Chromatographie sur couche des OPG extraits par la méthode rapide à l'éthanol pour les souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : EC3937, souche sauvage; NFB3541, *opgG* ; NFB3532, *opgH* , *sup-32* ; A1383, *ura-2*, *pro*, *arg*, *Stp^r*. Les sucres sont colorés en rouge.

observée en chromatographie sur couche mince pour des OPG extraits à basse osmolarité correspond donc aux OPG acétylés. L'analyse en chromatographie sur couche mince de la fraction anionique des OPG extraits à haute osmolarité montre une tâche dont la migration est supérieure au trois tâches formées par la fraction neutre des OPG (Fig R-6, B3 et B1). Si la fraction anionique des OPG extraits à haute osmolarité est soumise à un traitement alcalin alors la tâche supérieure disparaît et donne deux tâches qui migrent, à peu près, au même niveau que les deux tâches de la fraction neutre traitée à la soude (Fig R-6, B4 et B2). Ces résultats confirment que la fraction anionique porte un substituant lié par un liaison ester aux OPG, les résidus de O-succinyl. La séparation sur couche mince de trois formes d'OPG à basse osmolarité (trois tâches) n'est pas facilement interprétable. La comparaison des profils de migration des OPG natifs (trois tâches) ou traités à la soude (deux tâches) (Fig R-6) permet de penser que la tâche supérieure contient essentiellement des OPG acétylés. Afin de comprendre la nature de l'hétérogénéité mise en évidence par la chromatographie sur couche mince, chaque fraction a été éluée et analysée en spectrométrie de masse. Les résultats confirment la présence d'OPG acétylés dans la fraction migrant le plus haut sur la couche mince. La tâche du milieu contient également des OPG acétylés. On peut ainsi imaginer que le traitement à la soude provoque un déplacement des OPG des tâches, supérieure et intermédiaire, au profit des tâches intermédiaire et inférieure.

A la vue de ces nouveaux éléments, le crible appliqué aux OPG produits par les mutants potentiels n'aurait pas permis d'isoler un mutant déficient dans la succinylation des OPG. Ce crible aurait pu mettre en évidence un mutant déficient dans l'acétylation des OPG. Pour mettre en évidence un mutant déficient dans la succinylation des OPG, il faudrait envisager des cultures à haute osmolarité. Or dans ces conditions les cellules produisent dix fois moins d'OPG. Par conséquent il faudrait effectuer une extraction sur dix fois plus de cellules, ce qui augmenterait le bruit de fond sur les analyses chromatographique et d'un point de vue pratique rendrait le crible long, coûteux et fastidieux.

De façon fortuite, un mutant potentiel dans l'acétylation des OPG a été identifié. En effet, les OPG de la souche A1383 ont été analysés par chromatographie sur couche mince. Le profil de migration des OPG diffère de celui d'une souche sauvage et la tâche supérieure correspondant aux OPG acétylés est absente (Fig R-7). Des analyses complémentaires sur la structure des OPG produits sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

3 Expression hétérologue du gène *mdoB* d'*E. coli* chez *E. chrysanthemi*.

Le plasmide pNAV14 a été construit pour permettre l'intégration ectopique de gènes au locus *arb* (utilisation de l'arbutine comme source de carbone). Le locus *arb* a été cloné dans le vecteur pBR322 (le plasmide construit est Amp^r, Tet^s), ce locus est délété d'une région de 3,2 kb qui est remplacée par une cassette de 1,6 kb comportant deux résistances à la bléomycine et à la kanamycine et des sites de clonage interrompant les résistances. Le gène *mdoB* (2,3 kb) a été inséré au site de clonage *Sma*I. Les clones portant un plasmide recombinant sont criblés pour leur sensibilité à la bléomycine. Le plasmide pNF739 (Tet::*arb*::(Kan^r-Bleo::*mdoB*), Amp^r) isolé permet la complémentation de la mutation *mdoB*::Tn10 de la souche NFB732, prouvant la fonctionnalité de l'allèle contenu dans ce plasmide. Ce plasmide est introduit par électroporation dans la souche sauvage EC3937 d'*E. chrysanthemi*. Les clones recombinants sont sélectionnés sur kanamycine. Les trois clones obtenus, NFB3522, NFB3523 et NFB3524, sont Kan^r et Amp^r. Les OPG des clones obtenus incorporent du [2-³H] glycérol (Tableau R-1). Pour sélectionner l'intégration de *mdoB* au locus *arb* par recombinaison homologue, la perte du plasmide est facilitée par des cultures successives en milieu bas phosphate. Les cultures sont ensuite diluées et étalées sur boîtes LB+Kan, les clones isolés sont repiqués sur des boîtes LB+Amp et LB+Kan. Aucun ne présente une sensibilité à l'ampicilline prouvant que le plasmide n'est pas perdu. Dans des conditions similaires la perte du plasmide pNFW32 (*opgG*::*cml*) est obtenue et les clones Amp^s Cml^r sont Opg⁻ montrant l'interruption du gène *opgG* (construction de la souche NFB3541). La transduction du caractère Kan^r de la souche NFB3523 vers EC3937 ne permet pas la perte de la résistance à l'ampicilline, les clones NFB3525 et NFB3526 ainsi obtenus expriment l'activité phosphoglycéroltransférase (Tableau R-1). Il semble donc qu'un événement ait permis l'intégration du plasmide, mais le deuxième événement permettant la perte de la résistance à l'ampicilline et l'intégration stable de *mdoB* ne puisse se produire.

La virulence de la souche NFB3523 a été évaluée par rapport à une souche sauvage EC3937 et une souche Opg⁻, NFB3501. La souche portant le plasmide pNFB739 paraît aussi virulente que la souche sauvage (Fig R-8). Cependant uniquement 1 à 10 % des bactéries provenant des tissus macérés formés sur les tubercules de pommes de terre sont Kan^r, ces clones sont également Amp^r. Au cours de la croissance dans le tubercule de pomme de terre, le plasmide pNF739 est facilement perdu sans pression de sélection. Ces conditions

Souches	Radioactivité des extraits pyridine (en cpm)
EC3937	2200
NFB3500	1800
EC3937+pNF739 (<i>mdoB</i>⁺) Kan^r, Amp^r	
NFB3522	10400
NFB3523	6800
NFB3524	6700
NFB3523=>EC3937 Kan^r, Amp^r	
NFB3525	5600
NFB3526	5100
EC3937::<i>Tn5Cml</i>^r<i>mdoB</i>⁺	
moyenne sur 50 clones	2100
Complémentation chez <i>E. coli</i> NFB1864::<i>Tn5Cml</i>^r<i>mdoB</i>⁺	
Témoin NFB1864	1000
Clones MdoB ⁺	5200
Clones MdoB ⁻	900

Tableau R-1 : Radioactivité des extraits de pyridine après marquage en milieu LOS [2-³H] glycérol et extraction par adsorption des OPG sur charbon activé. Les résultats sont exprimés en cpm pour 0,2 ml d'extrait.

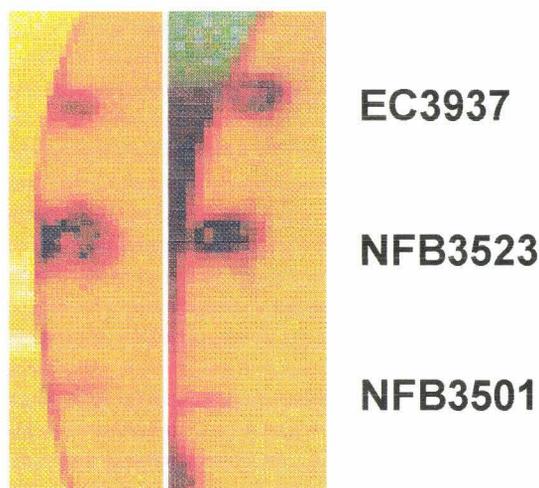


Fig R-8 : Tests de pathogénicité vis-à-vis du tubercule de pomme de terre des souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : EC3937, sauvage; NFB3523, pNF739(*mdoB*⁺)/EC3937; NFB3501, *opgH*. Après inoculation de 10⁷ bactéries de chaque souche, les tubercules ont été incubés 48 à 72 h à une température de 30 °C, puis sectionnés afin d'observer les symptômes de macération.

d'expression du gène *mdoB* ne permettent de faire aucune conclusion, puisque les bactéries perdant le plasmide redeviennent de type sauvage.

Le gène *mdoB* a donc été cloné dans le transposon mini-Tn5Cm^r du plasmide suicide pUT-Tn5Cm^r. Le gène codant la résistance au chloramphénicol et le gène *mdoB* sont divergents. Le plasmide pNF741 est transféré par conjugaison dans la souche EC3937. Les clones ayant acquis le transposon sont cultivés dans le milieu LOS en présence de [2-³H] glycérol. L'absence d'incorporation de radioactivité dans les OPG montre que ces clones n'expriment pas l'activité phosphoglycéroltransférase (Tableau R-1). La fonctionnalité de l'allèle *mdoB* portée par le transposon a été testée par sa capacité à compléter la mutation *mdoB*::Tn10. Dans ce cas, on constate que 70 % des souches NFB1864 résistantes au chloramphénicol incorporent du glycérol tritié sur ces OPG (Tableau R-1). Le gène *mdoB* n'a pas de promoteur clairement établi. Il semble que le fragment de 2,3 kb ne permette pas l'expression du gène *mdoB* et qu'il soit nécessaire d'obtenir une fusion transcriptionnelle.

C RECHERCHE DE SUPPRESSEURS DES MUTATIONS OPG⁻ CHEZ *E. chrysanthemi*

Chez *E. chrysanthemi*, les souches Opg⁻, NFB3500 (*opgG*) et NFB3501 (*opgH*) ne sont pas capables de former des colonies isolées sur milieu LB contenant 4g/l de sels biliaires contrairement à la souche sauvage EC3937 et présentent un défaut de motilité. Ces caractéristiques ont été utilisées pour sélectionner des pseudo-révertants.

Une mutagenèse à la nitrosoguanidine a été effectuée sur la souche NFB3501. Le choix de cette souche a été motivé par son phénotype plus marqué en ce qui concerne la motilité. La souche NFB3500 forme sur une boîte de gélose molle un halo réduit par rapport à celui observé pour une souche sauvage. La souche NFB3501 ne montre pas, quant-à-elle, de croissance au delà du point d'inoculation.

1 Mutations restaurant la croissance sur sels biliaires

Suite à la mutagenèse, 12 collections de mutants potentiels de la souche NFB3501 ont été formées. Pour isoler des pseudo-révertants capables de croître en présence de sels biliaires (sur milieu solide LB contenant une concentration en sels biliaires supérieure ou égale à 4 g/l)

0,1 ml de culture de chaque collection ou 0,1 ml des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ont été étalés sur boîtes LB + sels biliaries. Pour la première sélection, la concentration en sels biliaries était de 4 g/l.

De nombreux clones de différentes tailles sont apparus après 24H dans tous les cas. Dans les mêmes conditions aucun mutant spontané n'est observé sur les boîtes témoins sur lesquelles est étalée la souche NFB3501. Les clones obtenus ont été purifiés et leur capacité de croissance sur LB + 4 g/l réexaminée. La motilité de chacun d'eux a également été analysée. Aucun ne présente de motilité différente à celle de la souche d'origine NFB3501.

Devant le nombre important de pseudo-révertants obtenu à la concentration en sels biliaries de 4 g/l, la recherche de pseudo-révertants a été poursuivie uniquement sur deux collections et en effectuant des sélections sur des concentrations en sels biliaries variables : 4, 8, et 16 g/l. Le nombre de clones capables de croître sur sels biliaries diminue avec la concentration en sels biliaries. Huit clones ont été analysés. Leur capacité de croissance en présence de différentes concentrations en sels biliaries a été testée en milieu solide (Fig R-9). Cette analyse montre trois types de résistance aux sels biliaries : le type 1 présente une résistance supérieure à celle de la souche sauvage, le type 2 présente une résistance similaire à celle de la souche sauvage, le type 3 présente une résistance intermédiaire, à haute concentration de sels biliaries le pourcentage de survie est supérieur à celui de la souche sauvage. Dans tous les cas, les clones sélectionnés présente une résistance supérieure à la souche dont ils sont issus NFB3501. Le tableau R-2 montre les caractéristiques des huit clones analysés pour chaque collection. Les clones issus de la collection B ont tous une résistance de type 1 quelque soit la concentration en sels biliaries sur laquelle ils ont été isolés. Les clones issus de la collection A présentent les trois types de résistance. Le type de résistance aux sels biliaries suit le mode de sélection : les clones présentant une résistance similaire à la souche sauvage (type 2) ont été sélectionnés sur 4 g/l de sels biliaries, ceux présentant une résistance de type 1 ont été sélectionnés sur 8 g/l et ceux présentant une résistance de type 3 ont été sélectionnés sur 16 g/l de sels biliaries. Il semble donc qu'il y ait trois types de mutation. Bien qu'il soit impossible d'obtenir des révertants vrais, l'absence d'OPG a été vérifiée. L'identification des mutations n'a pas été réalisée, faute de temps.

2 Mutations restaurant la motilité

Pour isoler des pseudo-révertants de la motilité, des stries ou des gouttes de 5 μ l de culture de chaque collection ont été appliquées sur des boîtes de gélose molle (LB+3g/l

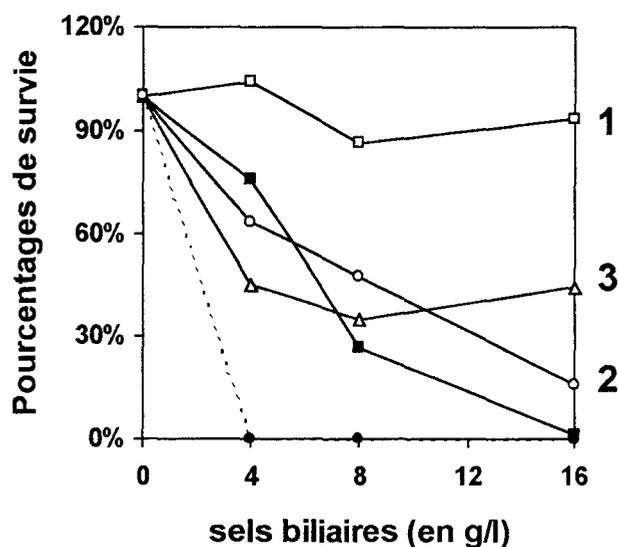


Figure R-9 : Types de résistance observés pour les pseudo-révertants isolés en fonction de leur croissance sur sels biliaries. Les résultats sont présentés en pourcentages de survie pour des concentrations en sels biliaries de 0 à 16 g/l dans le milieu solide LB. La résistance de la souche sauvage (EC3937, ■) est comparée à celle du mutant *opgH* (NFB3501, ●) et aux trois classes phénotypiques (1,2 et 3) observées (Δ, ○, □).

	Souches	Sélection sur SB (g/l)	Types de résistance aux sels biliaries	Motilité	Sécrétion de cellulase
Collection A	NFB3560	4	2	-	-
	NFB3561	4	2	-	-
	NFB3542	16	3	-	-
	NFB3543	16	3	-	-
	NFB3544	16	nd	-	-
	NFB3545	8	1	-	-
	NFB3546	8	1	-	-
	NFB3547	8	1	-	-
Collection B	NFB3548	4	1	-	nd
	NFB3549	4	1	-	nd
	NFB3550	16	1	-	nd
	NFB3551	16	1	-	nd
	NFB3552	16	1	-	nd
	NFB3553	8	1	-	nd
	NFB3554	8	1	-	nd
	NFB3555	8	1	-	nd

Tableau R-2 : Phénotype des pseudo-révertants isolés en fonction de leur croissance sur sels biliaries. Trois types de résistance aux sels biliaries sont observés chez les pseudo-révertants. Le type 1 correspond à des souches dont la résistance est supérieure à celle de la référence sauvage EC3937. Le type 2 est observé pour des souches dont la résistance est similaire à celle de la référence sauvage. Enfin, les souches du type 3 présentent un phénotype intermédiaire (voir également la figure R-9). nd : non déterminé; - : pas de motilité ou pas de sécrétion.

d'agar). Le lendemain, des halos apparaissaient à la périphérie des dépôts montrant la croissance de clones Mot⁺. Chaque pseudo-révertant a été réisolé sur boîte de LB + Kan et à nouveau testé sur gélose molle (Fig R-10). Tous les collections présentent au moins un pseudo-révertant, et il est possible d'observer deux phénotypes de motilité dans certains cas (Fig R-10). Pour la description des halos, deux paramètres sont évalués : le diamètre et l'aspect diffus (D) ou granuleux du trouble correspondant à la formation de microcolonies (M). Aucun clone ne présente une motilité équivalente à celle de la souche sauvage EC3937 (Fig R-11 A). 20 clones potentiellement indépendants ont été choisis. Pour chacun des clones la capacité de croissance sur LB + 4g/l de sels biliaires a été évaluée. Cette analyse montre que tous les clones testés possèdent la même sensibilité que la souche NFB3501 dont ils sont issus, à l'exception de la souche NFB3532 (Fig-R-12). Pour la suite des analyses, un petit nombre de pseudo-révertants a été choisi : NFB3527, NFB3530, NFB3532 et NFB3538 issus de deux collections différentes et présentant deux phénotypes de nage (Fig R-11 A et B). Le pseudo-révertant NFB3532 présente également une réversion des phénotypes de sécrétion de cellulases (Fig R-13 A) et de protéases (Fig R-13 B). La virulence vis-à-vis du tubercule de pomme de terre (Fig R-14 et R-15) a été estimée par rapport à la souche parentale et la souche sauvage. L'ensemble de ces expériences montre que les pseudo-révertants NFB3527, NFB3530, et NFB3538 ne sécrètent ni cellulase ni protéase et qu'ils ne sont pas virulents. Par contre la souche NFB3532 sécrète des exo-enzymes et induit la formation de pourriture lorsque l'inoculum est supérieure ou égale à 10⁸ bactéries. La souche parentale NFB3501 n'est pas virulente quelle que soit la taille de l'inoculum (Fig R-15). En conclusion, la souche NFB3532, isolée pour son caractère Mot⁺, a acquis une mutation suppressive particulière puisqu'elle permet de restaurer au moins partiellement les phénotypes sauvages : motilité, résistance aux sels biliaires, sécrétion d'exo-enzymes, et pathogénicité. Cependant des expériences préliminaires de coinoculation avec la souche sauvage semblent indiquer que cette souche est largement défavorisée dans la colonisation des tissus macérés. Les caractéristiques des différentes pseudo-révertants sont résumés dans le tableau R-3.

La poursuite des analyses génétiques n'a pas été faite par manque de temps. Cependant il est apparu que l'absence totale de motilité de la souche NFB3501 résulte d'une mutation supplémentaire.

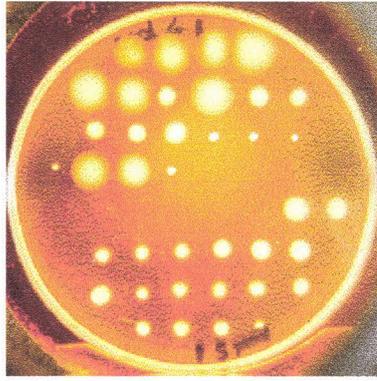


Figure R-10 : Analyse de la motilité des clones isolés après la première sélection sur boîtes de gélose molle permettant la visualisation de différents phénotypes de nage.

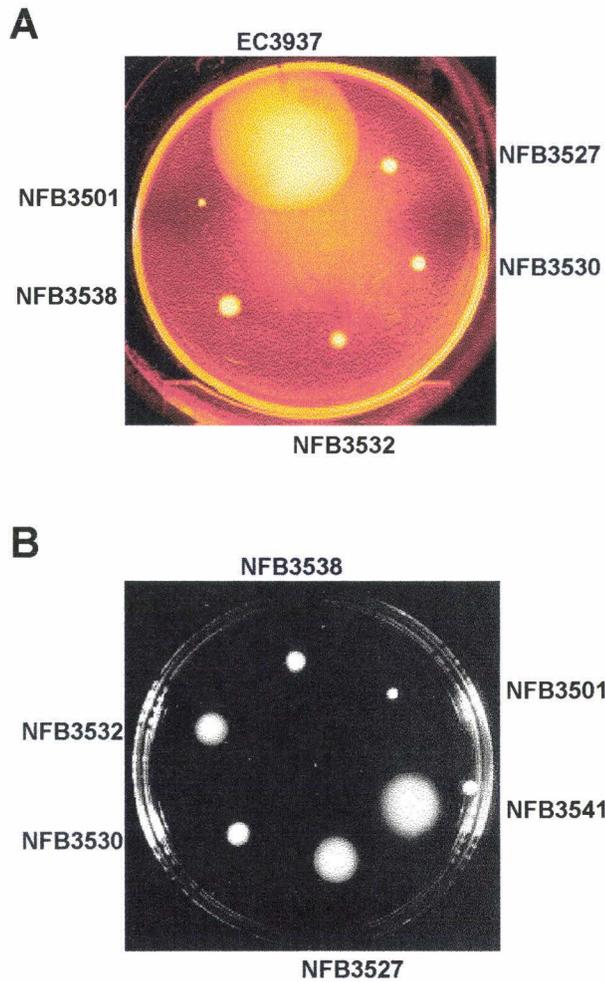


Figure R-11 : Motilité des pseudo-révertants Mot^+ issus de la souche NFB3501 (*opgH*). Les souches NFB3527 et NFB3530 d'une part et les souches NFB3532 et NFB3538 d'autre part proviennent de mêmes collections de mutants. EC3937, sauvage ; NFB3541 (*opgG*).

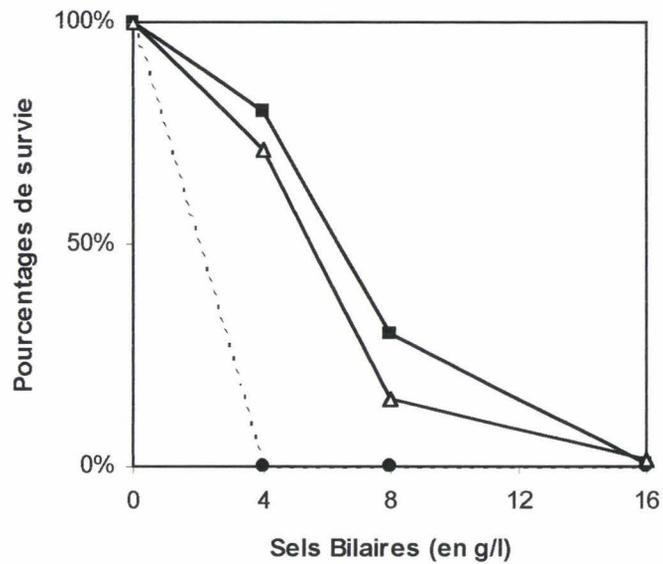


Figure R-12 : Résistance aux sels biliars des souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : (■) EC3937, (○) NFB3501, (Δ) NFB3532, pseudo-révertant Mot⁺ issu de NFB3501. Les résultats sont présentés en pourcentages de survie pour des concentrations en sels biliars de 0 à 16 g/l dans le milieu solide LB.

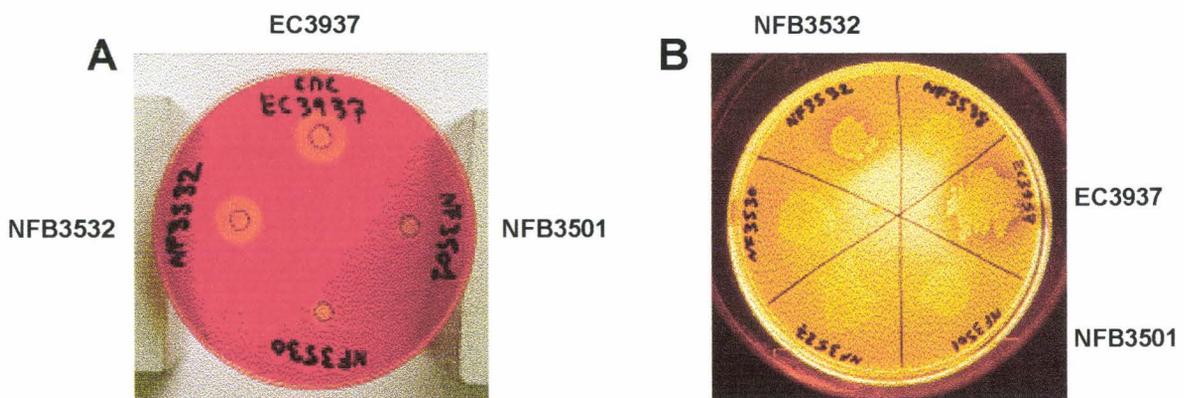


Figure R-13 : Sécrétion d'exoenzymes (A) cellulases, (B) protéases, des souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : EC3937, sauvage, NFB3501, *opgH*, NFB3532, pseudo-révertant Mot⁺ issu de NFB3501.

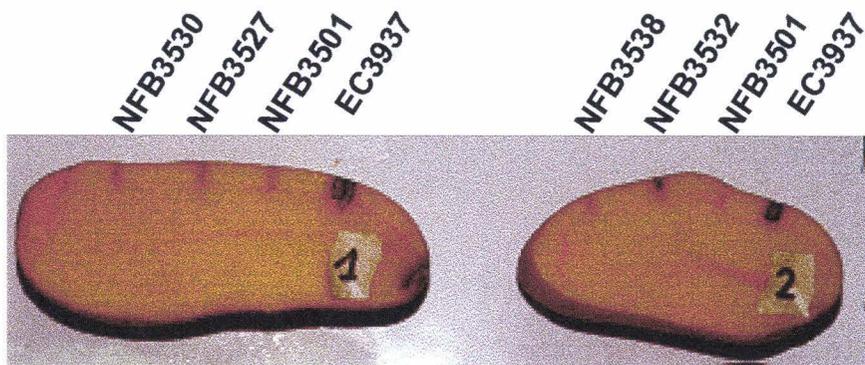


Figure R-14 : Tests de pathogénicité vis-à-vis du tubercule de pomme de terre des souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : EC3937, sauvage; NFB3501, *opgH* ; NFB3527, NFB3530, NFB3532, NFB3538, pseudo-révertants Mot⁺ issus de NFB3501. Après inoculation de 10⁷ bactéries de chaque souche, les tubercules ont été incubés 48 à 72 h à une température de 30 °C, puis sectionnés afin d'observer les symptômes de macération.

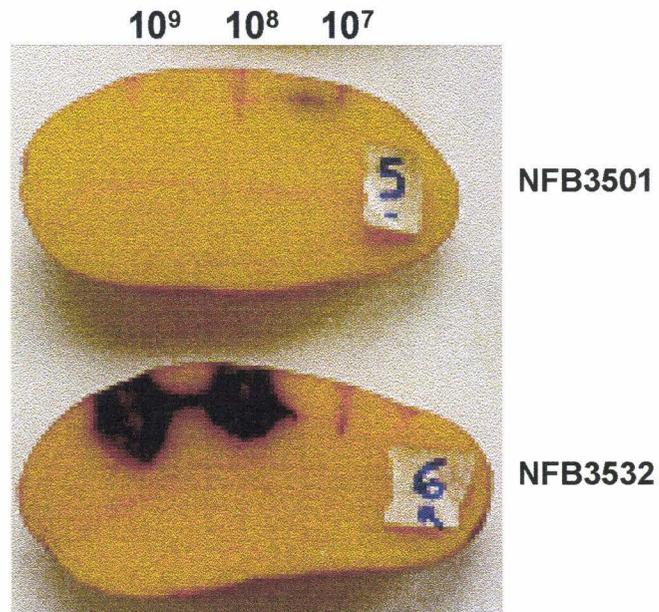


Figure R-15 : Tests de pathogénicité vis-à-vis du tubercule de pomme de terre des souches d'*E. chrysanthemi* suivantes : NFB3501, *opgH* ; NFB3532, pseudo-révertant Mot⁺ issu de NFB3501. Après inoculation de 10⁷, 10⁸ ou 10⁹ bactéries de chaque souche, les tubercules ont été incubés 48 à 72 h à une température de 30 °C, puis sectionnés afin d'observer les symptômes de macération.

Souches	Aspect du halo sur gélose molle	Croissance sur sels biliaires (4g/l)	Sécrétions		Virulence
			protéases	cellulases	
NFB3527	D	-	-	-	-
NFB3530	M	-	-	-	-
NFB3532	D	+	+	+	$\geq 10^8$
NFB3538	M	-	-	-	-

tableau R-3 : Caractéristiques des pseudo-révertants issus de NFB3501 sélectionnés sur gélose molle. Aspect du halo : D, diffus; M, microcolonies. - : pas de sécrétion ou pas de virulence. + phénotype inverse.

D DISCUSSION

1 La sécrétion des OPG

Pour doser les OPG dans le surnageant de culture, deux méthodes ont été utilisées pour séparer les cellules : la centrifugation et la filtration. Les deux méthodes donnent la même proportion d'OPG dans le surnageant. Cependant, les forces exercées sur les cellules lors de ces processus peuvent avoir provoqué le relargage des OPG. Afin d'exclure cette possibilité nous souhaitons réaliser un test d'accessibilité aux endoglucanases. Les endoglucanases commerciales sont des β -1,3 ou β -1,4 endoglucanases. Nous avons donc cherché à produire des enzymes capables de dégrader les OPG d'*E. chrysanthemi*. Pour cela, nous disposons d'une moisissure qui avait contaminé une préparation d'OPG désubstitués de *R. sphaeroides*. Nous supposons que ce microorganisme sécrétait les endoglucanases qui nous intéressaient. Pour cultiver ce champignon, Irina Sadovkaya, du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de l'Université du Littoral, nous a donné une quantité importante d'OPG cycliques β -1,2 et Bertrand Dehorter du laboratoire de cryptogamie et phytopathologie de l'USTL a effectué les cultures du champignon. L'activité β -1,2 endoglucanase des surnageants de culture a été analysée sur les OPG cycliques β -1,2 et les OPG produits par *E. chrysanthemi*. La cinétique d'apparition des produits de réaction sur couche mince montre une rapide dégradation des OPG cycliques β -1,2 et une faible dégradation des OPG produits par *E. chrysanthemi*. Plusieurs analyses semblent indiquer que la faible dégradation serait due en partie à la présence de la substitution par les résidus d'acétyle. La trop faible proportion

d'OPG d'*E. chrysanthemi* dégradés ne nous a pas permis de montrer la présence ou l'absence d'OPG solubles dans le milieu avant l'étape de séparation des cellules.

Il semble possible qu'une fraction des OPG soit sécrétée dans le milieu. On peut donc se demander si ces OPG éventuellement relargués dans le milieu jouent un rôle essentiel dans la virulence d'*E. chrysanthemi*. Les tests de virulence sur les tubercules de pomme de terre réalisés par co-inoculation avec la souche sauvage montrent que les souches Opg⁻ ne sont pas capables de croître dans le tissu macéré (Page, 2001). Cette expérience prouve que le défaut de virulence des souches Opg⁻ ne peut être compensé par la sécrétion d'OPG ou d'exoenzymes. La présence des OPG est ainsi nécessaire dans le périplasme et leur fonction principale s'effectue donc dans ce compartiment. Dans des expériences similaires de co-inoculation avec la souche sauvage, des mutants déficients dans la sécrétion peuvent croître dans les tissus macérés provenant de l'action de la souche sauvage (1% du co-inoculum). On peut donc en conclure que l'absence de virulence des souches Opg⁻ ne résulte pas de la réduction de sécrétion des exoenzymes. L'absence d'OPG conduit à une désorganisation de l'enveloppe qui pourrait empêcher la perception des signaux et l'engagement vers un état physiologique permettant la croissance dans le tissu hôte.

Chez *S. meliloti*, l'addition d'OPG exogènes ne restaure pas la formation de nodosité fonctionnelle chez un mutant *ndvB*. Par contre, l'addition d'OPG à l'inoculum d'une souche sauvage augmente la cinétique d'apparition et le nombre de nodosités formées sur la plante (Dylan et coll., 1990). D'autre part, Bhagwat et coll. (1999) ont montré que les OPG de *B. japonicum* peuvent avoir une fonction de suppression des défenses de l'hôte. Les OPG peuvent donc avoir une fonction secondaire lorsqu'ils sont sécrétés. Ils peuvent agir comme des molécules signal. D'autres fonctions secondaires peuvent être imaginées : les OPG pourraient interagir avec des composés toxiques libérés par l'hôte et ainsi les neutraliser ou ils pourraient permettre la concentration et la perception par la bactérie de petites molécules signal libérées par l'hôte. L'acquisition des fonctions secondaires peut être essentielle aux interactions avec l'hôte.

Si les OPG sécrétés assurent une fonction secondaire, la modification des OPG par les substituants pourrait permettre une dégradation moins rapide par des endoglucanases ou comme pour les facteurs Nod augmenter leur spécificité d'interaction avec leur cible.

2 Les gènes impliqués dans la substitution des OPG

Certains substituants (phosphoglycérol et succinyle) se retrouvent assez fréquemment liés aux OPG (Tableau I-1). Les activités permettant cette substitution sont du type phosphoglycéroltransférase ou succinyltransférase sur un résidu de glucose. Cependant les sites catalytiques peuvent reconnaître une portion plus large du squelette glucanique et dans ce cas le nombre de gènes impliqués dans la substitution des OPG peut être très élevé.

Les homologues, OpgC et MdoC, ne présentent aucune similitude. Ces deux OPG-succinyltransférases substituent des squelettes assez différents. Chez *E. coli*, MdoC transfère des résidus de succinyle sur des glucanes linéaires β -1,2 portant des résidus de glucose liés en β -1,6. Chez *R. sphaeroides* OpgC transfère des résidus de succinyle sur des glucanes cycliques β -1,2 avec une liaison α -1,6. L'expression hétérologue d'OpgC chez *E. coli* ne permet qu'une faible substitution des OPG linéaires branchés. OpgC substitue normalement des chaînes glucosidiques β -1,2, la présence des branches en β -1,6 peut donc représenter un obstacle. Puisque l'expression d'*opgC* est obtenue par couplage traductionnel avec *opgH*, il est possible que la protéine OpgH permette la synthèse d'OPG plus long présentant moins de branches. La substitution s'effectuerait sur cette classe minoritaire d'OPG. La substitution par les résidus de succinyle s'effectuant rapidement et certainement conjointement à la synthèse du squelette (Lequette et Bohin, communication personnelle), la synthèse des OPG pourrait s'effectuer sous le contrôle d'un complexe multiprotéique. Une autre éventualité pour expliquer la faible substitution est donc que les protéines MdoH et OpgC interagissent peu.

La recherche des gènes similaires à *mdoC* montre que celui-ci est conservé chez plusieurs entérobactéries. Cependant, on remarque que le pourcentage de similitude est beaucoup moins élevé que pour les gènes impliqués dans la synthèse du squelette glucanique (*mdoG* et *mdoH*). La comparaison de ces nouvelles protéines de type MdoC permet de définir des régions conservées plus restreintes. On peut donc envisager de chercher à nouveau par PCR à l'aide d'amorces dégénérées, le gène codant l'OPG-succinyltransférase chez *E. chrysanthemi*. L'organisation des gènes *mdoC* et *mdoGH* est assez conservée chez les enterobactéries. Cette organisation suggère une corégulation entre ces gènes. Chez *E. chrysanthemi* le gène codant l'OPG-succinyltransférase n'est pas localisé à proximité des gènes *opgGH* et d'autre part le taux de substitution augmente de façon inverse par rapport à la quantité d'OPG.

Le gène *opgC* présente des similitudes avec des gènes chez *R. capsulatus* et éventuellement chez *V. cholerae*. Deux familles d'OPG-succinyltransférases semblent donc se profiler. La succinyltransférase impliquée dans la substitution des OPG cycliques β -1,2 chez *S. meliloti* n'est pas identifiée. Il est possible que cette fonction soit assurée par une protéine de type *OpgC* puisque la spécificité de substrat accepteur semblerait être une chaîne glucosidique β -1,2.

Les gènes homologues *cgmB* et *mdoB* substituent respectivement les OPG produits par *S. meliloti* et *E. coli*. Les séquences protéiques de ces OPG-phosphoglycéroltransférases ne présentent aucune similitude. De plus, leur mode de fonctionnement diffère. Dans un cas la substitution peut s'effectuer dans le périplasma via une protéine soluble (*S. meliloti*), dans l'autre cas il est nécessaire d'avoir une forme liée qui effectue la substitution primaire (*E. coli*).

La diversité des gènes impliqués dans la substitution peut résulter d'une coévolution des OPG. L'apparition des substituants confèrerait de nouvelles propriétés aux OPG qui peuvent présenter un avantage.

L'expression hétérologue du gène *mdoB* chez *E. chrysanthemi* n'est que transitoire. Cependant cette expression transitoire ne semble pas provoquer les mêmes défauts que l'absence d'OPG. En effet, l'expression du gène *mdoB* lors de l'inoculation des tubercules de pommes de terre ne provoque pas de retard dans l'apparition des tissus macérés. La présence des résidus de phosphoglycérol sur les OPG n'empêche donc pas la croissance des bactéries sur l'hôte. Cette substitution ne modifie donc pas suffisamment les propriétés des OPG pour abolir leur fonction principale dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe.

3 Mutations suppressives des phénotypes *Opg*⁻

Chez *S. meliloti*, les pseudo-revertants sélectionnés pour la restauration de la motilité ont acquis une mutation qui permet la restauration d'autres fonctions végétatives mais la relation symbiotique n'est que très faiblement restaurée (Dylan, 1990). Chez *E. chrysanthemi*, la plupart des pseudo-révertants dont la motilité est restaurée présentent les mêmes défauts que la souche d'origine, NFB3501. Un pseudo-révertant, NFB3532, isolé pour la restauration de la motilité (fonction végétative) présente également la restauration, du moins partielle, des autres fonctions végétatives (résistance aux sels biliaires et sécrétion d'exoenzymes) et également regagne une certaine virulence. La découverte d'une mutation supplémentaire dans la souche NFB3501 qui réduit la motilité empêche une comparaison stricte entre les classes de pseudo-

révertants obtenus chez *S. meliloti* et *E. coli*. Cette mutation préexistante peut cependant être nécessaire à l'obtention d'une souche présentant les restaurations de la souche NFB3532. La recherche de nouveaux pseudo-révertants dans un contexte Opg^- "propre" permettra de répondre à cette question.

L'analyse chromatographique sur couche mince (Fig R-7) de l'extrait éthanolique des cellules de la souche NFB3532 montre la présence d'une traînée rouge qui peut correspondre à l'apparition d'oligosaccharides associés aux cellules et éventuellement dans le périplasme. Ceux-ci compenseraient partiellement le défaut d'OPG. La perturbation du métabolisme de biosynthèse des exopolysaccharides, comme chez les pseudo-révertants isolés chez *S. meliloti* pourrait engendrer la formation de ce matériel. Chez *S. meliloti*, Nagpal et coll. (1994) ne décèlent pas d'oligosaccharides neutres de taille intermédiaire dans le périplasme ; mais ces résultats ne permettent pas d'exclure la présence d'oligosaccharides chargés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Même si le rôle des OPG n'est pas clairement défini, il est remarquable de constater que, chez toutes les espèces testées, les OPG sont indispensables aux interactions hôtes-bactéries. De plus la présence des OPG est requise à l'intérieur du périplasme, ils n'ont donc pas un rôle direct dans l'interaction. On constate également que les bactéries affectées dans la synthèse des OPG sont fortement immunogènes, elles survivent dans l'hôte infecté mais sont incapables de s'y développer. Ces observations mettent en évidence une nouvelle cible pour les agents antibactériens : la voie de biosynthèse des OPG.

Dans ce but, on peut tout d'abord déterminer la représentativité des trois systèmes identifiés comme impliqués dans la synthèse du squelette glucanique. Le séquençage de 89 génomes bactériens et leur disponibilité sur les banques de donnée permet de révéler la présence majoritaire du système de type *mdoGH* (Tableau I-1). Ce système est présent chez de nombreuses bactéries pathogènes vis-à-vis de l'animal ou de la plante. L'élaboration d'un agent antibactérien peut donc prendre pour cible l'inhibition du système de biosynthèse des OPG : de type MdoG-MdoH.

D'autre part, on constate que les substituants des OPG peuvent également jouer un rôle dans le processus pathogène (Bowe et coll., 1998). Néanmoins, les OPG peuvent comporter plusieurs types de substituants ou ne pas en comporter. Dans le cas où plusieurs substituants sont présents, la déficience de l'un d'entre eux peut être compensée par la présence ou l'augmentation des autres. Puisque, chez *S typhimurium* (Bowe et coll., 1998), l'inactivation du gène *mdoB* conduit à une réduction de la virulence, la substitution des OPG peut représenter une cible dans la recherche d'inhibiteur. Dans ce cas la recherche porte sur un agent antibactérien spécifique d'une espèce ou d'un ensemble de bactéries. Ce type d'agent bactériostatique peut être particulièrement utile puisqu'il évite la destruction de la flore commensale qui constitue une barrière à la surinfection par des bactéries opportunistes.

La mise en évidence des activités des protéines de type MdoG est d'un grand intérêt puisque leur localisation périplasmique en font des cibles préférentiellement plus accessibles aux inhibiteurs. L'expression hétérologue de la protéine OpgG de *R. sphaeroides* chez *E. coli* permettrait une démonstration rapide des activités assurées par les protéines de type MdoG.

Plusieurs résultats semblent indiquer que la fonction primordiale des OPG est d'interagir et de stabiliser les bicouches lipidiques des membranes internes et externes, et contribue directement à la stabilisation des complexes protéiques ou indirectement en influençant la fluidité des membranes (Crowe et coll., 1984 ; Banta, 1998 ; Bohin , 2000). La découverte récente de nombreux gènes composant le régulon σ_E , induit en présence de protéines mal conformées dans l'enveloppe, (Dartigalongue et coll., 2001) ouvre la possibilité de réaliser des expériences permettant d'étayer cette hypothèse.

MATERIELS ET METHODES

A. SOUCHES ET MILIEUX

1. Génotype des souches et plasmides utilisés.

Les souches d'*E. coli* et d'*E. chrysanthemi* utilisées sont décrites dans le tableau MM-1 et le tableau MM-2 respectivement. Les plasmides utilisés sont décrits dans le tableau MM-3. Les souches et plasmides décrits dans les articles ne sont pas repris dans ces tableaux.

2. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C ou à 30°C. Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C. Les cultures liquides sont soumises à une agitation de 150 rpm.

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

Milieu LB, Luria broth (Miller, 1992).

Milieu LB-NaCl même composition que le milieu LB en omettant le sel pour réduire l'osmolarité.

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

Milieu de basse osmolarité, Los (Kennedy, 1982) : K_2HPO_4 (1 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (1,5 mM), $MgCl_2$ (0,08 mM), $FeSO_4$ (0,5 mg/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 (1 M) et complémenté si nécessaire. L'osmolarité de ce milieu est de 66mosM et peut être augmentée par l'addition de NaCl à une concentration de 0,3 M.

Milieu Bas Phosphate : Tris-HCl 120mM, NaCl 90mM, KCl 40mM, NH_4Cl 21mM, $CaCl_2$ 0,1mM, $MgCl_2$ 1mM, Na_2SO_4 25 μ M, KH_2PO_4 0,5mM, bactopectone 0,25%, pH7,4. Ce milieu carencé en phosphate sert de milieu de culture pour favoriser la perte de plasmides, et est complémenté par une source de carbone et les acides aminés adéquats (Torriani, 1968).

Milieu Mac Conkey (Difco laboratories)

Pour la détermination du pourcentage de survie en fonction de la concentration en sels biliaires, les bactéries sont étalées sur boîtes de milieu LB gélosé contenant des concentrations variables de sels biliaires (Bile salts N°3, Difco laboratories).

Les milieux solides sont obtenus par addition d'agar à 15g/l. Les antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : Ampicilline, 50µg/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* ; Chloramphénicol 25 µg/ml pour *E. coli*, 5 µg/ml pour *E. chrysanthemi* ; Rifampicine 100 µg/ml pour *E. coli*, 50 µg/ml pour *E. chrysanthemi* ; Streptomycine 50 µg/ml pour *E. coli*, Bléomycine 5 µg/ml pour *E. coli*.

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

B. TECHNIQUES GENETIQUES

1. Transduction

Les transductions utilisant le phage Φ EC2 ont été réalisées d'après Résibois et coll. (1984).

2. Conjugaison

a) Isolement de R-prime

Le plasmide R110, un dérivé de RP4::mini-Mu sensible à la kanamycine et résistant à la tétracycline et l'ampicilline (Van Gijsegem et coll., 1982), a été utilisé pour la mobilisation d'ADN chromosomique. Les deux bactéries à conjuguer, dont l'une contient le plasmide R110, sont cultivées durant la nuit dans du milieu LB. Deux cents microlitres 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 des boîtes de milieu sélectif.

b) Transfert ectopique du gène *mdoB*

Le plasmide pNF741 porte le gène *mdoB* dans un mini-Tn5cm^l. Ce plasmide contient une origine de réplication RK6 qui dépend de la présence du gène *pir* et une séquence *mob* permettant la mobilisation en *trans*. La conjugaison est réalisée entre les souches pNF741/SM10λ*pir* et EC3937 comme précédemment.

3. Transformation

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

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

4. Mutagenèse par la N'-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine

La mutagenèse par la N'-methyl-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 ($5 \cdot 10^8$ bactéries/ml). Un millilitre de culture est lavé par du tampon TM (Tris 50 mM, acide maléique 50 mM, $MgSO_4$ 8 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 15 mM, pH 6) puis repris dans 1 ml de tampon TM. Après ajout de NTG à une concentration finale de 100µg/ml, les bactéries sont incubées 30 min à 37°C. Elles 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. Les mutations sont intégrées dans le chromosome par échange d'allèles au cours de 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.

C. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Extraction et purification d'ADN

L'ADN plasmidique est préparé en grande quantité selon la méthode du "lysats clair" décrite par Clewell et Helinski (1969).

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 lorsqu'on privilégie son activité exonucléase 3' → 5', et dans ce même tampon complété par les 4 dNTP à une concentration finale de 2 mM lorsqu'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 un tampon Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 0,66 mM, β-mercaptoéthanol 1mM, pH 7,6.

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

3. Electrophorèse

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 (1µg/ml) et de RNase (4µg/ml ; Sigma), dans un 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. Délétion par l'exonucléase 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

Les amorces dégénérées "antisens" sont :

MFNFIVMantisens	GCGGATCCCATSACRATRAARTTRAACAT <i>Bam</i> HI
DAWMYETantisens	TCGAATTCSTGNTTCRTACATCCASGCRTC <i>Eco</i> RI

Les réactions de PCR comprennent 30 cycles. Pour chaque cycle la température est ajustée à 94°C pendant 1min (dénaturation), entre 37°C et 60°C pendant 1min (hybridation) et à 72°C pendant 1min (polymérisation).

D. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1. Dosage des OPG chez *E. coli*

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 une 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 4 volumes de charbon de bois en suspension dans l'eau (50 mg/ml) sur lequel les OPG s'absorbent. Après deux rinçages à l'eau distillée, destinés à éliminer la radioactivité non spécifique, les molécules adsorbées sur le charbon sont extraites deux 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 culture, 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 des OPG est analysé, après rassemblement et concentration des fractions contenant les OPG à l'aide d'un évaporateur rotatif, par la méthode colorimétrique utilisant le réactif à l'antrone (Spiro, 1966).

2. Extraction rapide des OPG à l'éthanol

Cette technique est utilisée pour l'analyse rapide du phénotype Opg des clones recombinants d'*E. chrysantemi*. Les souches sont cultivées dans 3 ml de milieu LB-NaCl en phase stationnaire. Puis les bactéries sont centrifugées, le culot cellulaire est lavé par 1 ml d'eau et resuspendu par 0,1 ml d'eau puis on ajoute 0,2 ml d'éthanol à 95%. La suspension est ensuite chauffée au bain marie à 70°C pendant 30 minutes. Les tubes sont centrifugés 10 min à 15000 g et le surnageant contenant les OPG est séché sous vide. Les OPG sont remis en solution dans 15 µl d'éthanol 70% 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 isoprpanol/éthanol/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 des OPG en grande quantité, la culture est arrêtée en phase stationnaire par centrifugation à 4°C 15 min à 5000g. Le culot de cellules est repris dans un volume minimum d'eau puis traité au TCA 5% final pendant 30 min avec une forte agitation. Après centrifugation 10 min à 15000g, 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 ainsi 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. Dosage des succinates

Du MDO purifié (1 mg) est resolubilisé dans 0,2 ml de soude 0,5 N et chauffé à 100°C pendant 30 minutes. Un millilitre de charbon végétal (50 mg/ml) est ajouté pour éliminer le

squelette glucosidique. Le tube est agité 10 min et centrifugé 5 min. Le surnageant est conservé et le culot est lavé trois fois par 0,5 ml d'eau. Les surnageants sont réunis et désionisés sur minicolonne Dowex 50x8 sous forme H⁺. Le produit après élution par de l'eau (deux volumes de colonne) est réduit à un volume de 1 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif puis lyophilisé. Il est ensuite exactement repris dans 1 ml d'eau mQ et la quantité de succinate présent est déterminée à l'aide du kit « succinic acid » (Boehringer Mannheim).

5. Détection des activités enzymatiques sur boîte de Petri.

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

Le test cellulase (Teather et Wood, 1982) se réalise sur une boîte de milieu minimum solide contenant de la carboxyméthylcellulose (0,2%), du glycérol (0,2%) et du MgSO₄ (7mM). Après 24h de croissance à 30°C, les boîtes sont recouvertes pendant 15 min d'une solution aqueuse de rouge congo (1mg/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 1M. 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 24h 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.

6. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin (Lowry et coll., 1951) ; une solution de sérum-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 10⁷ à 10⁹ 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 10⁶ bactéries dans un volume de 5 μ l, les feuilles sont incubées pendant 24 à 48h.

Tableau MM-1 : génotype des souches d'*E. coli* K12 utilisées

Souches	Génotypes	Source / Référence
CT110	<i>thy, met, ile, kdgR, kdgT, gal, mal, mtl, rpsL</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat
DH5 α	<i>thi-1, $\Delta(lac)U169, recA1, hsdR17, gyrA96, relA1, endA1, supE44, \Phi80lacZ\Delta M15$</i>	
HB101	<i>proA2, leu, araA14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, hsdS20, recA13, rpsL, glnV44</i>	
SM10 λ pir	<i>thi-1, thr, leu, lacY, recA::RP4-2-Tet::Mu-Kan^r, tonA, supE, rpoB, λpir</i>	De Lorenzo et Timmis
BW10724	<i>thi, $\Delta(lac)U169, recA::cat-aadA$ (Cml^r), pho-510, $\lambda recA^+$</i>	
NFB1864	<i>$\Delta(lac-pro), thi, ara, mdoB214::Tn10, mdoC1::Tn5, rpsL, \Phi80lacZ\Delta M15$</i>	
NFB1953	NFB1864, <i>recA::Cml^r</i> , P1 BW10724=>NFB1864	Cette étude
NFB1844	<i>met, gal, lacY, hsdS, fhuA, supE, mdoG202::neo</i>	

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

Souches	Génotypes	Source / Référence
EC3937	sauvage	Kotoujansky et coll., 1982
NFB3500	EC3937, <i>opgG500::uidA-Kan^r</i>	Page, 1998
NFB3501	EC3937, <i>opgH501::uidA-Kan^r</i>	Page, 1998
A1383	EC3937, <i>ura-2, arg, pro, Str^r</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
NFB3541	EC3937, <i>opgG502::Cml^r</i>	Cette étude
NFB3527	NFB3501, <i>sup-27</i>	Cette étude
NFB3530	NFB3501, <i>sup-30</i>	Cette étude
NFB3532	NFB3501, <i>sup-32</i>	Cette étude
NFB3538	NFB3501, <i>sup-38</i>	Cette étude
NFB3567	NFB3501, <i>sup-67</i>	Cette étude

Tableau MM-3 : caractéristiques des plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Source / Référence
pNAV14	pBR328 contenant le locus <i>arbGPB</i> d' <i>E. chrysanthemi</i> interrompu par la cassette K1XX Kan ^r , Bleo ^r (Pharmacia)	Barras F.
pUTmini-Tn5Cml ^r		De Lorenzo et Timmis
R110	RP4 Tet ^r , Amp ^r , Kan::Mu3A	Hugouvieux-Cotte-Pattat N.
pNF739	<i>mdoB⁺</i> dans pNAV14	Cette étude
pNF741	<i>mdoB⁺</i> dans pUTminiTn5Cml ^r	Cette étude

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aldeberg, E. A., M. Mandel, and G. Chein Ching Chen.** 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N'-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**:788-795.
- Altabe, S. G., N. Iñón de Iannino, D. de Mendoza and R. A. Ugalde.** 1994. New osmoregulated $\beta(1,3),\beta(1,6)$ glucosyltransferase in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **176**: 4890-4898.
- Altabe, S. G., P. Talaga, J.-M., Wieruszeski, G. Lippens, R. Ugalde, and J.-P. Bohin.** 1998. Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*, p. 390. In C. Elmerich, A. Kondorosi, W. E. Newton (ed), *Biological nitrogen fixation for the 21st century*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Andersson, H. and G. von Heijne.** 1993. Sec dependant and Sec independant assembly of the *E. coli* inner membrane proteins: the topological rules depend on chain lenght. *EMBO J.* **12**: 693-691.
- Banta, L. M., J. Bohne, S. D. Lovejoy and K. Dostal .** 1998. Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J Bacteriol.* **180**:6597-606.
- Batley M., J. W. Redmond, S. P. Djordjevic and B. G. Rolfe.** 1987. Characterization of glycerophosphorylated cyclic β -(1,2)-glucans from fast-growing *Rhizobium* species *Biochim. Biophys. Acta.* **901**: 119-126.
- Battisti, L., J. C. Lara, and J. A. Leigh.** 1992. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5626-5629.
- Bayer, M.E.** 1968. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **53**:395-404.
- Bayer, M.E.** 1979. The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection, p.167-202. In M. Inouye (ed.) *Bacterial Outer Membranes, Biosynthesis, Assembly, and Function.* John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bayer, M.E.** 1991. Zones of membrane adhesion in the cryofixed envelope of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **107**:268-280.
- Becker, A., S. Rüberg, H. Küster, A. A. Roxlau, M. Keller, T. Ivashina, H.-P. Cheng, G. Walker, and A. Pühler.** 1997. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium*

meliloti directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol. **179**:1375-1384.

- Berck, S., X. Perret, D. Quesada-Vincens, J. Prome, W. J. Broughton and S. Jabbouri.** 1999. NodL of *Rhizobium* sp. strain NGR234 is required for O-acetyltransferase activity. J Bacteriol. **181**:957-964.
- Bernadac, A, M. Gavioli, J.-C. Lazzaroni, S. Raina and R. Llobes.** 1998. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. J Bacteriol. **180**:4872-8.
- Beveridge, T. J. and L. L. Graham.** 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol Rev. **55**:684-705.
- Bhagwat A. A., R. E. Tully and D. L. Keister.** 1993. Identification and cloning of a cyclic β -(1,3), β -(1,6)-D-glucan synthesis locus from *Bradyrhizobium japonicum*. FEMS Microbiol. Lett. **114**: 139-144.
- Bhagwat, A. A., A. Mitöfer, P. E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel, and D. L. Keister.** 1999. Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1 \rightarrow 3)- β -glucosyl. Plant Physiol. **119**:1057-1064.
- 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**:221-31.
- Bliss, J. M. and R. P. Silver.** 1997. Evidence that KpsT, the ATP-binding component of an ATP-binding cassette transporter, is exposed to the periplasm and associates with polymer during translocation of the polysialic acid capsule of *Escherichia coli* K1. J Bacteriol. **179**:1400-3.
- 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**:956-7.
- 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.
- Bohin J.-P.** Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000. **186**:11-9.
- Boivin, C., et J. Dénarié.** 1998. La symbiose rhizobiums-légumineuses : gènes et signaux de nodulation en perspective. Bull. Soc. Fr. Microbiol., **3**:226-232.
- Boivin, C., I. Ndoye, G. Lortet, A. Ndiaye, P. de Lajudie, and B. Dreyfus.** 1997. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *Sesbania teranga* bv. *sesbaniae* can from stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1040-1047.
- Bowe, F., C. J. Lipps, R. M. Tsolis, E. Groisman, F. Heffron and J. G. Kusters.** 1998. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal

infection of mice. *Infect Immun.* **66**:3372-7.

Bradbeer, C. 1993. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3146-3150.

Brass, J. M., Higgins, C. F., Foley, M., Rugman, P.A., Birmingham, J. and P.B. Garland. 1986. Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**:787-794.

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. and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58**:145-161.

Bull. Soc. Fr. Microbiol., 14 n°1,2,4, 1999

Cangelosi, G. A., G. Martinetti and Nester EW. 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic beta-1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**:2172-4.

Carpentier, B. 1999. Les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **2**:121-126.

Cayley D. S., H. J. Guttman and M. T. Jr Record. 2000. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys J.* **78**:1748-64.

Cheng, H.-P., and G. C. Walker. 1998. Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS/ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **180**:20-26.

Chou, 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.

Choudhary, M., C. MacKenzie, K. Nereng, E. Sodergren G., M. Weinstock and S. Kaplan. 1997. Low resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1^T: Chromosome II is a true chromosome. *Microbiology* **143**:3085-3099.

Choudhary, M., C. MacKenzie, K. Nereng, E. Sodergren G., M. Weinstock and S. Kaplan. 1994. Multiple chromosomes in bacteria: structure and fonction of chromosome II of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Bacteriol.* **176**:7694-7702.

Clarke, B. R., R. Pearce, and I. S. Roberts. 1999. Genetic organization of the *Escherichia coli* K10 capsule gene cluster: identification and characterization of two conserved regions in group III capsule gene clusters encoding polysaccharide transport

functions. *J. Bacteriol.* **181**:2279-2285.

- Clewell, D. B., and D. R. Helinski.** 1969. 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**:1159-1166.
- Click, E. M. and R. E. Webster.** 1998. The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage ϕ 1 during infection. *J Bacteriol.* **180**:1723-8.
- Cook, W.R., and L. I. Rothfield.** 1994. Early stages in development of the *Escherichia coli* cell-division site. *Mol. Microbiol.* **14**: 485-495.
- Cook, W.R., T. J. Macalister, and L. I. Rothfield.** 1986. Compartmentalization of the periplasmic space at division sites in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **170**:1430-1438.
- Cooksey, K.E.** 1992. Extracellular promoters in biofilms. In "Biofilms-Science and technology" Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (eds), Kluwer Academic Press, Dordrecht pp 137-147
- Costerton, J. W., K. J. Chen, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and G., James.** 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**:2137-2142.
- Crowe, J. H., L. M. Crowe and D. Chapman.** 1984. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem Biophys.* **232**:400-7.
- 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. pp 1210-1223.
- Dartigalongue, C., D. Missiakas and S. Raina.** 2001. Characterization of the *Escherichia coli* σ E Regulon. *J Biol Chem.* Mar 23
- Davies, D.G., A. M. Chakrabarty and G. G. Geesey.** 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **59**:1181-6.
- 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. Mulders, L. Goosen-de Roo, M. C. van Loosdrecht, C. A. Wijffelman and B. 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 the infection thread. *J Bacteriol.* **171**:1143-1150.

- 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**:216-20.
- Dénarié, J., F. Debellé, and J.-C. Promé. 1996. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **65**:503-535.
- Denny, T.P., L.M. Ganova-Raeva, J. Huang, and M.A. Schell. 1996. Cloning and characterization of *tek*, the gene encoding the major extracellular protein of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **9** : 272-281.
- Doig P, Kinsella N, Guerry P, Trust TJ. 1996. Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol Microbiol.* **19**:379-387.
- Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A., and Nester, E.W. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.
- Dowhan, W. 1992 Strategies for generating and utilizing phospholipid synthesis mutants in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **209**:7-20.
- Dubochet, J., McDowall, A.W., Menge, B., Schmid E.N., and K.G., Lickfeld. 1983. Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *J. Bacteriol.* **155**:381-390.
- 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**:546-55.
- Dylan, T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas, M. Yanofsky, E. Nester, D. R. Helinski and G. Ditta. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4403-4407.
- Dylan, T., P. Nagpal, D. R. Helinski and G. S. Ditta. 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J Bacteriol.* **172**:1409-17.
- Ebel W., G. J. Vaughn, 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.
- Fellay, R, M. Hanin, G. Montorzi, J. Frey, C. Freiberg, W. Golinowski, C. Staehelin, W. J. Broughton and S. Jabbouri. 1998. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Mol Microbiol.* **27**:1039-1050.
- Fiedler, W. and H. Roterling. 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**:14684-14689.

- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W.J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**:394-401.
- Galanos, C., O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura et al. 1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* **148**:1-5.
- Geiger, O., A. C. Weissborn and E. P. Kennedy. 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **173**:3021-3024.
- 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**:1410-3.
- Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegthart JF, Morag E, Lamed R, Bayer EA. 1993. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. *J Biol Chem* **268**:26956-26960.
- Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegthart JF, Morag E, Lamed R, Bayer EA. 1992. Novel oligosaccharide constituents of the cellulase complex of *Bacteroides cellulosolvens*. *Eur J Biochem.* **205**:799-808.
- Glazebrook, J., and G. C. Walker. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**:661-672.
- Glucksmann, M. A., T. L. Reuber, and G. C. Walker. 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**:7045-7055.
- Goldberg, D. E., M. K. Rumley and E. P. Kennedy. 1981. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglyceroltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:5513-5517.
- Golenbock, D. T., B. Y. Hampton, N. Qureshi, K. Takayama and C. R. Raetz. 1991. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem.* **266**:19490-19498.
- Gottesman, S., and V. Stout. 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **5**:1599-1606.
- Graham, L.L., Harris, R., Villiger, W., and T.J. Bevirgde. 1991. Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J. Bacteriol.* **173**:1623-1633.
- Grandjean, V., Y. Hauck, C. Beloin, F. Le Hegarat, and L. Hirschbein. 1998. Chromosomal inactivation of *Bacillus subtilis* exfusants: a prokaryotic model of epigenetic regulation. *Biol Chem.* **379**:553-557.
- Grandjean, V., Y. Hauck, J. Le Derout, and L. Hirschbein. 1996. Noncomplementing

diploids from *Bacillus subtilis* protoplast fusion : relationship between maintenance of chromosomal inactivation and segregation capacity. *Genetics*. **144**:871-881.

Grebe, T. W., and J. B. Stock. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**:139-227.

Guerry P, Doig P, Alm RA, Burr DH, Kinsella N, Trust TJ. 1996. Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin. *Mol Microbiol.* **19**:369-78

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.

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**:245-8.

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

Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene.* **28**:351-359.

Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y., and S. Yasuda. 1977. On the process of cellular division in *Escherichia coli* : a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:1417-1420.

Hisamatsu M., T. Yamada, T. Higashiura and M. Ikeda. 1987. The production of acidic, O-acylated cyclosporans (cyclic β -(1,2)-D-glucans) by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. res.* **163**:115-122.

Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W, and E. Kellenberger. 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* **160**:143-152.

Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**:193-7.

Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Rev.* **62**:379-433.

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.

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.

- Ingaham, J. L. and A. G. Marr.** 1996. Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Neidhardt FC (Ed in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp: 1570-1578.
- Inon de Iannino, N., G. Briones, M. Tolmasky and R. A. Ugalde.** 1998. Molecular cloning and characterization of *egs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J Bacteriol.* **180**:4392-400.
- Jabbouri, S., B. Relic, M. Hanin, P. Kamalaprija, U. Burger, D. Prome, J. C. Prome and W. J. Broughton.** 1998. *nolO* and *noeI* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors. *J Biol Chem.* **273**:12047-55.
- Jabbouri, S., R. Fellay, F. Talmont, P. Kamalaprija, U. Burger, B. Relic, J. C. Prome and W. J. Broughton.** 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J Biol Chem.* **270**:22968-22973.
- 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
- Jann, B., and K. Jann.** 1990. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **159**:19-42.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, D. O'Callaghan and M. Ramuz.** 1998b. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* **27**:99-106.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz and A. Allardet-Servent.** 1998a. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol.* **180**:2749-55.
- Kadner R. J.** 1996. Cytoplasmic 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. pp:58-87
- Karls RK, Jin DJ, Donohue TJ.** 1993. Transcription properties of RNA polymerase holoenzymes isolated from the purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **175**:7629-38.
- Kastowsky, M., T. Gutberlet, and H. Bradaczek.** 1992. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. bacteriol.* **174**:4798-4806.
- Katzen, F., D. U. Ferreira, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler and L. Ielpi.** 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol.* **180**:1607-17.

- Kelley, W., and C., Georgopoulos.** 1997. Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA : a member of the DnaJ family molecular chaperons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**:913-931.
- Kennedy E. P.** 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1092-1095
- Kennedy E. P.** 1996. Membrane-Derived Oligosaccharides (periplasmic β -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. pp:1064-1071
- Kiley, P. J., and S. Kaplan.** 1988. Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev* **52**: 50-69.
- Kolter, R and R. Losik.** 1998. One for All and All for One. *Science.* **280**:226-227.
- Kotoujansky, 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.
- Lacroix J.-M., I. Loubens, M. Tempete, B. Menichi and J.-P. Bohin.** 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* **5**:1745-1753.
- Lacroix, J.-M.** 1989. Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. Thèse de Docteur en Sciences. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay.
- Lanfroix, E.** 1997. La substitution des glucanes périplasmiques osmorégulés d' *Escherichia coli*. Thèse de Docteur en Sciences. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay.
- Lang, H. P., and C. N. Hunter.** 1994. The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. J.* **298**:197-205.
- Lazdunski, C. J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubes and H. Benedetti.** 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **180**:4993-5002.
- Lazzaroni, J.-C., P. Germon, M. C. Ray and A. Vianney.** 1999. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett.* **177**:191-7.
- Leduc, M., Frehel, C., and J. van Heijenoort.** 1985. Correlation between degradation and ultrastructure of peptidoglycan during autolysis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**:1243-1254.
- Leduc, M., Frehel, C., Siegel, E. and J. van Heijenoort.** 1989. Multilayer distribution of peptidoglycan in periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1243-1254.
- Leigh, J. A. and G. C. Walker.** 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium* : synthesis,

regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**:63-67.

- 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.
- 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.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Prome and J. Denarie.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* **344**:781-784.
- Levin, J., C. R. Alving, R. S. Munford, and P. L. Stütz (ed.)** 1993. Endotoxin research series, vol 2. Bacteria endotoxin: recognition and effector mechanisms. Excerpta Media, Amsterdam.
- Lippens, G., J. -M. Wieruszkeski, P. Talaga, J. -P. Bohin and H. Desvaux.** 1996a. Correlation between the chemical shift values and precise interglycosidic distance measurements in the cyclic glucan of *Burkholderia solanacearum*. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:7227-7228.
- Lippens, G., J.-M. Wieruszkeski, P. Talaga and J.-P. Bohin.** 1996b. Measurement of three-bond coupling constants in the osmoregulated periplasmic glucans of *Burkholderia solanacearum*. *J. Biomol. NMR* **8**:311-318.
- Lis, H., and N. Sharon.** 1993. Protein glycosylation. Structural and fonctionnal aspects. *Eur. J. Biochem.* **218**:1-27.
- Long, S.R., and B.J. Staskawicz.** 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell.* **73** : 921-935.
- Lopez, N. I., A. S. Haedo, and B. S. Mendez.** 1999. Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in a soil microcosm system. *Int. Microbiol.* **2**:111-114.
- 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.
- Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Mear, B. Dreyfus, J.C. Promé, and C. Boivin.** 1997. Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* *Sesbania*-nodulating strains are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**:879-890.
- 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.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

- MacAlister, T. J., B. MacDonald, and L. I. Rothfield.** 1983. The periseptal annulus: an organelle associated with cell division in Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1372-1376
- MacLachlan, P. R., W. J. Keenleyside, C. Dodgson, and C. Whitfield.** 1993. Formation of the K30 (group I) capsule in *Escherichia coli* O9:K30 does not require attachment to lipopolysaccharide lipid A-core. *J. Bacteriol.* **175**:7515-7522.
- Maeba PY.** 1986. Isolation of a surface glycoprotein from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **166**:644-650.
- Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G Rahme, and F. M. Ausubel.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47-56.
- Manson, M. D., J. P. Armitage, J. A. Hoch, and R. M. Macnab.** 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* **180**: 1009-1022.
- Martin-Didonet, C. C., L. S. Chubatsu, E. M. Souza, M. Kleina, F. G. Rego, L. U. Rigo, M. G. Yates and F. O. Pedrosa.** 2000. Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J Bacteriol.* **182**:4113-4116.
- Melakanos, J.J.** 1991. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174** : 1-7.
- Mergaert, P., M. Ferro, W. Dhaeze, M. van Montagu, M. Holsters, and J.-C. Promé.** 1997. Nod factors from *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group or both. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**:683-687.
- Messner, P.** 1997. Bacterial glycoproteins. *Glycoconj. J.* **14**:3-11.
- 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 E. P. Kennedy.** 1987. Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the Membrane-Derived Oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:682-686.
- Miller, K. J., and Wood, J. M.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:101-136.
- Miller, K. J., E. P. Kennedy and V. N. Reinhold.** 1986. Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**:48-51.
- Miller, K. J., R. S. Gore and A. J. Benesi.** 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**:4569-4575.
- Mills, D. and P. Mukhopadhyay.** 1990. Organization of the *hrpM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis, p. 47-57. *In* S.

Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Missiakas, D., Betton, J.-M., and S., Raina.** 1996. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* : SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* **21**:871-884.
- 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.
- Moens S, Michiels K, Keijers V, Van Leuven F, Vanderleyden J.** 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *lafI*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Bacteriol.* **177**:5419-26.
- Montreuil, J., J. F. G. Vliegthart, and H. Schaster (eds).** 1995. Glycoproteins, New comprehensive Biochemistry. Vol 29a, Amsterdam. Elsevier.
- Nagpal, P., S. P. Khanuja and S. W. Stanfield.** 1992. Suppression of the *ndv* mutant phenotype of *Rhizobium meliloti* by cloned *exo* genes. *Mol Microbiol.* **6**:479-88.
- Nanninga, N.** 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:110-129.
- Nereng K. S. and S. Kaplan.** 1999. Genomic complexity among strains of the facultative photoheterotrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **181**:1684-1688.
- Newman, M. A., J. Conrads-Strauch, G. Scofield, M. J. Daniels and J. M. Dow.** 1994. Defense-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact.* **7**:553-63.
- Nikaido H.** 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**:435-442.
- Nikaido H.** 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem.* **269**:3905-3908.
- Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 5853-5859.
- Nikaido, H.** 1999. Microdermatology : cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. bacteriol.* **181**:4-8.
- Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nikaido, H., Bavoil, P., and Y. Hirota.** 1977. Outer membrane of Gram-negative bacteria. XV. Transmembrane diffusion rates in lipoprotein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **132**:1045-1047.

- Oliver, 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. pp:88-103.
- Ophir, T., and D. L. Gutnick.** 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from dessication. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 740-745.
- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., and J. Carson.** 1972. Mechanism of assembly of outer membrane of *Samonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. **247**:3962-3972.
- Page, F.** 1998. Les glucanes périplasmiques osmorégulés d'*Erwinia chrysanthemi* et *Escherichia coli* : relation avec la phytopathogénicité et régulation génétique de la biosynthèse. Thèse de doctorat de l'université des sciences et technologies de Lille.
- Page, F., S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy and J.-P. Bohin.** 2001. Osmoregulated Periplasmic Glucan Synthesis Is Required for *Erwinia chrysanthemi* Pathogenicity. J Bacteriol. **183**:3134-41.
- 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. pp:48-57.
- Parker, C. T., A. W. Kloser, C. A. Schnaitman, M. A. Stein, S. Gottesman, and B. W. Gibson.** 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **174**:2525-2538.
- Pearce, R. and I. S. Roberts.** 1995. Cloning and analysis of gene clusters for production of the *Escherichia coli* K10 and K54 antigens: identification of a new group of *serA*-linked capsule gene clusters. J. Bacteriol. **177**:3992-3997.
- Pfeffer, P. E., S. F. Osman, A. Hotchkiss, A. A. Bhagwat, D. L. Keister and K. M. Valentine.** 1996. Cyclolaminarinose. A new biologically active beta-(1-->3) cyclic glucan. Carbohydr Res. **296**:23-37.
- Plummer Jr, T. H., A. L. Tarentino, and C. R. Hauer.** 1995. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. Asp-Ser and Asp-Thr-Thr consensus sites. J. Biol. Chem. **270**:13192-13196.
- Postle, K.** 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. J. Bioenerg. Biomemb. **25**: 591-601.
- Pratt, L.A., 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.
- Prigent-Combaret, C., et P. Lejeune.** 1999. La génétique de la formation du développement des biofilms. Bull. Soc. Fr. Microbiol. **2**:121-126.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative Bacteria. Microbiol. Rev. **57**:50-108.

- Raetz C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt F.C. (Ed in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp:1035-1063.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins and F. M. Ausubel.** 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 268:1899-902.
- Raina, S., R. Raina, T. V. Venkatesh and H. K. Das.** 1995. Isolation and characterization of a locus from *Azospirillum brasilense* Sp7 that complements the tumorigenic defect of *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutant. *Mol Plant Microbe Interact.* 8:322-6.
- Reinhold, B. B., C. R. Hauer, T. H. Plummer, and V. N. Reinhold.** 1995. Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* 270:13197-13203.
- Reinhold, B. B., S. Y. Chan, T. L. Reuber, A. Marra, G. C. Walker, and V. N. Reinhold.** 1994. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 176:1997-2002.
- Resibois, A., M. Cochet, M. Faelen, M. Schoonejans, and A. Toussaint.** 1984. Phi-EC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology.* 137:102-112.
- Reuber, T. L., and G. C. Walker.** 1993. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 175:3653-3655.
- Roche, P., F. Debellé, F. Maillet, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié, and J. C. Promé.** 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67:1131-1143.
- Roche, P., F. Maillet, C. Plazanet, F. Debellé, M. Ferro, G. Truchet, J. C. Promé, and J. Dénarié.** 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15305-15310.
- Roeder, D. L., and A. 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. Szwergold, F. Kappler, and A. J. Benesi.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochem. Biophys. Acta* 1116:215-225.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K., and U. Bonas.** 1999. The Xanthomonas Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9368-9373.
- Rothfield, L. I., and W. R. Cook.** 1988. Periseptal annuli: organelles involved in the bacterial cell division process. *Microbiol. Sci.* 5:182-185.

- Rumley, M.K., H. Thérísod, A.C. Weissborn, E.P. Kennedy.** 1992. Mechanisms of regulation of the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:11806-11810.
- Russo, T. A., B. A. Davidson, R. L. Priore, U. B. Carlino, J. D. Helinski and P. R. Knight 3rd.** 2000. Capsular polysaccharide and O-specific antigen divergently modulate pulmonary neutrophil influx in an *Escherichia coli* model of Gram-negative pneumonitis in rats. *Infect Immun.* **68**:2854-62.
- 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.
- Sambri V, Stefanelli C, Cevenini R.** 1992. Detection of glycoproteins in *Borrelia burgdorferi*. *Arch Microbiol.* **157**:205-208.
- 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 inhibitors. *Biotechnology.* **24**:104-108.
- Sàra, M., and U. Sleytr.** 2000. S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**:859-868.
- Saxena, I.M., R.M. Brown Jr., M. Fevre, R.A. Geremia, and B. Henrissa.** 1995. Multidomain Architecture of β -glucosyl transferases : implications for mechanism of action. *J. Bac.* **177**:1419-1424.
- Schaeffer, P., B. Cami, and R. D. Hotchkiss.** 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**:2151-2155.
- Schmidt, A. M., and K. Jann.** 1982. Phospholipid substitution of capsular (K) polysaccharide antigens from *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *FEMS Microbiol. Lett.* **14**:69-74.
- Schneider, J.E., V. Reinhold, M.K. Rumley, E.P. Kennedy.** 1979. Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**:10135-10138.
- Schultze, M. and A. Kondorosi.** 1996. The role of lipochitooligosaccharides in root nodule organogenesis and plant cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* **6**:631-638.
- Shin, S. and C. Park.** 1995. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol.* **177**:4696-702.
- Silhavy, T. J., M. N. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Slater, H., A. Alvarez-Morales, C. E. Barber, M. J. Daniels and J. M. Dow.** 2000. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol.* **38**:986-1003.

- Sledjeski, D. D., and S. Gottesman.** 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**:1204-1206.
- Smith, S. H. and R. G. Murray.** 1990. The structure and associations of the double S layer on the cell wall of *Aquaspirillum sinuosum*. *Can J Microbiol.* **36**:327-35.
- Spaink, H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. J. Lugtenberg.** 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**:125-130.
- Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* **8**:3-27
- 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.
- Stimson, E., M. Virji, K. Makepeace, A. Dell, H. R. Morris, G. Payne, J. R. Saunders, M. P. Jennings, S. Barker, M. Panico et al.** 1995. Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol.* **17**:1201-14.
- 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. pp:1103-1129.
- Stock, J. B., B. Rauch and S. Roseman.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**:7850-7861.
- Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* **127**:531-540.
- 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.
- Stout, V., and S. Gottesman.** 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 659-669.
- Sugawara, E., and H. Nikaido.** 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 2507-2511.
- Sutherland I. W.** 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int Rev Cytol.* **113**:187-231.

- Suwanto, A. and S. Kaplan. (1989). Physical and genetic mapping of the regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450-490.
- Suwanto, A. and S. Kaplan. (1992) Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **174**:1135-1145.
- Swart S, Logman TJ, Smit G, Lugtenberg BJ, Kijne JW. 1994. Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisumsativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. *Plant Mol Biol.* **24**:171-83.
- Swart, S., B. 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**:3816-9.
- Swart, S., G. Smit, B. 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.
- 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.
- Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:2408-13
- 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**:3697-705.
- Teather, R. M., and P. J. Wood. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* **43**:777-780.
- 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**:8235-8.
- Torriani A. 1968. Alkaline phosphatase subunits and their dimerization *in vivo*. *J Bacteriol.* **96**:1200-7.
- Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. D. Billy, J. C. Promé and J. Dénarié. 1991. Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**:670-673.
- 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.

- 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 den Boom, T. and J. E. Cronan, Jr.** 1989. Genetic and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**:317-343.
- Van Gijsegem, F. and A. Toussaint.** 1982. Chromosome transfer and R-prime formation by an RP4::mini-Mu derivative in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Plasmid.* **7**:30-44.
- van Golde, L. M., Schulman, H., and E. P. Kennedy.** 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**: 1368-1372.
- van Heijenoort, J.** 1996. Murein synthesis. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Neidhardt FC (Ed in chief) 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp: 1025-1034.
- van Wielink, J., and J. A. Duine.** 1990. How big is the periplasmic space? *Trends Biochem. Sci.* **15**:136-137.
- Varga, A. R., and S. Kaplan.** 1993. Synthesis and stability of reaction center polypeptides and implications for reaction center assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem.* **268**:19842-50.
- 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. pp:955-965.
- Wang, P., C. Ingram-Smith, J. A. Hadley and K. J. Miller.** 1999. Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic beta-glucan biosynthesis. *J Bacteriol.* **181**:4576-83.
- Webster R. E.** 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**:1005-11.
- 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**:8062-7.
- Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**:1307-1320.
- Whitfield, C., and M. A. Valvano.** 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**:135-246.
- Woldringh, C. L.** 1994. Significance of plasmolysis spaces as markers for periseptal annuli and adhesion sites. *Mol. Microbiol.* **14**:597-607.

- York W. S.** 1995. A conformational analysis for cyclic β -(1-2)-linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**:205-222.
- Zeilstra-Ryalls J. H., and S. Kaplan.** 1995. Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the genetic basis of mutant H-5 auxotrophy. *J. Bacteriol.* **177**:2760-2768.
- Zeilstra-Ryalls J. H., and S. Kaplan.** 1996. Control of *hemA* expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: regulation through alterations in the cellular redox state. *J. Bacteriol.* **178**:985-993.
- Zeilstra-Ryalls, J., Gomelsky, M., Eraso, J.M., Yeliseev, A., O'Gara, J., and S. Kaplan.** 1998. Control of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **180**:2801-2809.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., A. van Veldhuizen and R. H. Fokkens.** 1990. Re-examination of cellular β -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-1-phosphate substitution. *Antonie Leeuwenhoek.* **57**:173-178.
- ZoBell, C.E.** 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**:39-56.
- Zorreguieta, A. and R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in beta-D(1-2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**:947-51.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Article 1

Osmoregulated periplasmic glucans of *Rhodobacter sphaeroides*. Talaga, P, Cogez, V., Wieruszeski, J.-M., Bohin, A., Lippens, G., & Bohin, J.-P. (soumis à European Journal of Biochemistry).

ANNEXE 2 : Article 2

Osmoregulated Periplasmic Glucans production in *Rhodobacter sphaeroides* : Analysis of the structure and function of the *opg* locus. Puskas, A., Cogez, V., Gak, E., Bohin, J.-P., & Kaplan, S. (soumis à European Journal of Biochemistry).

ANNEXE 3 : Article 3

The *opgC* and *opgGIH* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of Osmoregulated Periplasmic Glucanes. Cogez, V., Pukas A. , Gak E., Kaplan S., & Bohin, J.-P. (en préparation).

ANNEXE 4 : Article 4

Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J., & Bohin, J.-P. (accepté pour publication dans Journal of Bacteriology)

ANNEXE 5 : Article 5

The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. Lacroix, J.-M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A., & Bohin, J.-P. (1999) J Bacteriol,181:3626-31.

Osmoregulated periplasmic glucans of *Rhodobacter sphaeroides*

Philippe Talaga¹, Virginie Cogez¹, Jean-Michel Wieruszeski², Bernd Stahl³,

Jérôme Lemoine¹, Guy Lippens², and Jean-Pierre Bohin¹.

Laboratoire de Chimie Biologique, CNRS UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France¹, CNRS UMR8525, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France², and Milupa GmbH & Co. KG, Research International, D-61381-Friedrichsdorf, Germany³

Running title: OPGs of *Rhodobacter sphaeroides*

Correspondence to Jean-Pierre Bohin, CNRS UMR8576, Bât.C9, U.S.T.L., 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: +33 (0)3 20 43 65 92; Fax: +33 (0)3 20 43 65 55; Electronic mail address: Jean-Pierre.Bohin@univ-lille1.fr

SUMMARY

The osmoregulated periplasmic glucans produced by *Rhodobacter sphaeroides* were isolated by trichloroacetic acid treatment and gel permeation chromatography. Compounds obtained were characterized by compositional analysis, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *R. sphaeroides* synthesizes predominantly a cyclic glucan containing 18 glucose residues which can be substituted by one to seven succinyl esters residues at the C₆ position of some of the glucose residues, and by one or two acetyl residues. The glucans were then subjected to a mild alkaline treatment in order to remove succinyl and acetyl substituents, analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and further purified by high-performance anion-exchange chromatography. Methylation analysis revealed that this glucan is linked by seventeen 1,2 glycosidic bonds and one 1,6 glycosidic bond. Homonuclear and ¹H/¹³C heteronuclear nuclear magnetic resonance experiments revealed the presence of a single α-1,6 glycosidic linkage, whereas all other glucose residues are β-1,2 linked. The different anomeric proton signals allowed a complete sequence-specific assignment of the glucan. The structural characteristics of this glucan are very similar to the previously described osmoregulated periplasmic glucans of *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris*, except for its different size and the presence of substituents.

INTRODUCTION

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are general constituents of the envelope of Gram-negative bacteria [1]. Their abundance in the periplasmic space is the greatest when the medium osmolarity is very low. Under these conditions, OPGs can represent between 5 and 10 percents of the cellular dry weight. These compounds play an important role in the interaction with specific plant hosts: in *Sinorhizobium meliloti* [2] and *Bradyrhizobium japonicum* [3], they are essential for the nitrogen fixation, and in *Agrobacterium tumefaciens* [4] and *Pseudomonas syringae* [5-6], for the development of plant disease. However, beyond this functional homology, and the fact that glucose is the sole monosaccharide present, OPGs from various origins display an unexpected structural diversity. This variation occurs at two levels: the glucose backbone organization, and the absence or the presence of various substituents.

Four families of OPGs can now be distinguished:

(i) OPGs of *Escherichia coli*, *P. syringae* and *Erwinia chrysanthemi* appears to range from 6 to 13 glucose residues ([7-8]; Coge, V., Talaga, P., Stahl, B. & Bohin, J.-P., unpublished work). The structure is highly branched, the backbone consisting of a β -1,2 linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages [8-9]. The OPGs of *E. coli* are highly substituted with *sn*-1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and succinyl ester residues [7]. The OPGs of *P. syringae* are neutral [8].

(ii) OPGs of *S. meliloti* [10], *A. tumefaciens* [10], and *Brucella* spp. [11] are composed of a cyclic β -1,2 glucans backbone containing 17 to 40 glucose units per ring. They can be substituted by *sn*-1-phosphoglycerol, methylmalonic acid, or succinic acid depending on the species considered [12-14].

(iii) Extracts of *B. japonicum* revealed the presence of β -1,3;-1,6 cyclic glucans containing 10 to 13 glucose units [15-16]. They can be substituted by phosphocholine [15]. Very similar OPGs were found in *Azospirillum brasilense* but no substituent was detected in this case [17].

(iv) *Ralstonia solanacearum* [18] and *Xanthomonas campestris* [18-19] synthesize OPGs which have a unique degree of polymerization (13 and 16, respectively). They are cyclic, and are linked by β -1,2 glycosidic bonds and one α -1,6 glycosidic bond. These glucans possess no substituent.

Based on their 16S rRNA sequences, the purple bacteria (*Proteobacteria*) are divided into four subdivisions: α , β , γ , and δ/ϵ [20]. *Proteobacteria* of the γ subgroup (*E. coli*, *E. chrysanthemi* and *P. syringae*) synthesize OPGs belonging to the first family (heterogeneously sized linear and branched β -1,2;-1,6 linked glucans). *Proteobacteria* of the α subdivision (*S. meliloti*, *A. tumefaciens*, and *Brucella* spp.) synthesize OPGs belonging to the second family (cyclic β -1,2 linked glucans). However, the parallel breaks down with *B. japonicum* and *A. brasilense*, two other members of the α subdivision, that synthesize OPG belonging to the third family (homogeneously sized cyclic and branched β -1,3;-1,6 linked glucans). Moreover, *X. campestris* (γ subdivision) and *Ralstonia solanacearum* (β subdivision) synthesize OPGs which belong to the fourth family (homogeneously sized cyclic α -1,6; β -1,2 linked glucans). Thus, whereas the differences observed among the structures appear to be somewhat correlated to the phylogenetic positions of the organisms among *Proteobacteria*, several exceptions are known at this moment.

Rhodobacter sphaeroides is a member of the alpha subdivision whose genetic analysis is highly developed essentially because it is a remarkable model for the study of bacterial photosynthesis [21]. The purpose of the present work was to determine the structural features

of the OPGs synthesized by *R. sphaeroides*, and remarkably, we found that they belong to the fourth family, with a 18-membered cyclic β -1,2 structure except for one single α -1,6 bond. This rises the question of the gene products involved in the biosynthesis of these molecules.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth. *R. sphaeroides* strains WS8 and NFB4000 (an *opgC* mutant of WS8; 6) were grown in LOS medium (a low osmolarity medium) at 30°C with agitation [8]. When necessary, the osmolarity of the medium was increased by the addition of 0.4 M NaCl.

Isolation and purification of osmoregulated periplasmic oligosaccharides. Bacteria were collected during the stationary phase of growth by centrifugation at 4°C for 15 min at 8,000 x g. Cell pellets were extracted with 5 % trichloroacetic acid (TCA), the TCA extracts were neutralized with ammonium hydroxide, and were desalted on a Sephadex G-15 column. The desalted material was then fractionated by gel filtration on a Bio-Gel P-4 (Bio-Rad). The column (55 x 1.6 cm) was eluted at room temperature with 0.5% acetic acid at a flow rate of 15 mL.h⁻¹ and fractions of 2.5 mL were collected. The oligosaccharides emerged in a peak of intermediate weight detected by the phenol-sulfuric acid procedure [22]. Fractions containing oligosaccharides were pooled and lyophilized.

A different procedure was followed when the purpose was the confirmation of acetyl substitution of OPGs. Cell pellets were washed and resuspended in distilled water, and then extracted with two volumes of ethanol. After concentration in a rotary evaporator, the extract was fractionated on a Bio-Gel P-4 column equilibrated and eluted with distilled water.

MALDI mass spectrometry. The experiments were carried out on a VISION 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm wavelength and a 3 ns pulse width). After selection of the appropriate site on the target by a microscope, the laser light was focused onto the sample/matrix mixture at an angle of 15° and at a power level of 10⁶ to 10⁷ watts.cm⁻². Positive ions were extracted by a 5-10 keV acceleration potential, focused by a lens and the masses separated in a reflectron time of flight instrument. At the detector, ions were postaccelerated to 20 keV for maximum detection efficiency. The resulting signals were recorded with a fast transient digitizer with a maximum of 2.5 ns channel resolution, and transferred to a PC for accumulation, calibration, and storage. All MALDI mass spectra are the result of a 20 single-shot accumulation.

The following matrices for carbohydrates analysis were used: 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 g.L⁻¹ in water; [23]) and 3-aminoquinolin (10 g.L⁻¹ in water; [24]). Lyophilized oligosaccharides samples were redissolved in doubly distilled water and then diluted with an appropriate volume of the matrix solution (1:5, v/v). 1 µL of the resulting solution was deposited onto a stainless steel target, and the solvent was evaporated under gentle stream of warm air.

Deesterification of the oligosaccharides. For removal of the succinyl and acetyl substituents, oligosaccharides were treated in 0.1 M KOH at 37°C for 1 hour. After neutralization with AG 50W-X8 (H⁺ form, Bio-Rad), the samples were desalted on a Bio-Gel P-2 column

High performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Analysis of oligosaccharides was performed on a CarboPac PA100 anion-exchange column (4 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA), equipped with a CarboPac PA guard column (3 x 25 mm, Dionex). Oligosaccharides were detected with pulsed amperometric

detector PAD II with a gold electrode (Dionex). The following pulse potentials and duration were used for detection: $E_1 = 0.05$ V ($t_1 = 300$ ms); $E_2 = 0.60$ V ($t_2 = 120$ ms); $E_3 = -0.60$ V ($t_3 = 300$ ms). The chromatographic data were integrated and plotted using a Spectra-Physic model SP 4270 integrator (San Jose, CA). Oligosaccharides were eluted at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ by a two-step procedure consisting of (a) 0.05 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 5 min, and (b) a linear gradient of 0.05-0.2 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 35 min. After every run, the column was re-equilibrated in 0.05 M NaOH in 0.15 M NaOH for 15 min.

Preparation of the oligosaccharides was done in a similar way on a Carbopac PA-1 (10 x 250) at a flow rate of 2 mL.min⁻¹. Fractions were collected, and separated on a AG 50W-X8 (H⁺ form, 100-200 mesh, Bio-Rad) column (5 x 1 cm) eluted with water. By this procedure, sodium acetate was converted into acetic acid and NaOH into water. The acetic acid produced by this method was neutralized by NH₄OH. Some Na⁺ was left, which was subsequently removed by desalting on a Biogel-P4 column. The concentration of the contaminating oxidized products was low enough that it did not interfere with the analysis.

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

NMR spectroscopy. Prior to NMR spectroscopic analysis, the oligosaccharides were twice treated with $^2\text{H}_2\text{O}$ at room temperature. After each exchange treatment, the materials were lyophilized. The NMR experiment on the native glucans were performed on a Bruker AM-400 WB spectrometer equipped with a 5-mm mixed ^1H - ^{13}C probehead. The NMR experiments on the purified KOH treated glucan were performed on a Bruker DMX-600 Spectrometer equipped with a triple resonance $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ self-shielded z-gradient probehead at a temperature of 28°C . All spectra were recorded without sample spinning. HSQC-NOESY experiments were obtained with NOE mixing times of 100 to 300 ms; HSQC-TOCSY were performed with 100 to 200 ms mixing times and the HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) were realized with a 100 ms delay for evolution of long range coupling ($^3\text{J } ^1\text{H}$ - ^{13}C) of 5 Hz [18, 27].

Others methods. Protein concentrations were determined with the method of Lowry *et al.* [28] with bovine serum albumin as a reference protein. Total carbohydrate concentrations were determined by the phenol-sulfuric acid method of Dubois *et al.* [22] with D-glucose as the standard. Sugar analysis was carried out by gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of methyl glycosides formed by methanolysis in 0.5 M HCl in methanol at 80°C for 24 h [29]. Reducing sugars were measured with the same method after reduction of the oligosaccharides with NaBH_4 . Total phosphorus were measured as previously described [8].

RESULTS

Isolation and characterization of the osmoregulated periplasmic oligosaccharides.

Osmoregulated periplasmic oligosaccharides were extracted from cells of *R. sphaeroides* which were grown in a medium of low osmolarity, according to previously described

procedures which involve trichloroacetic extraction and fractionation on Bio-Gel P-4. The osmoregulated periplasmic oligosaccharides emerged in a peak of intermediate molecular weight (fractions 60 to 85). No high-molecular weight lipo- or exopolysaccharides were observed. The amount of the osmoregulated periplasmic oligosaccharides was 29 μg of equivalent glucose per mg of cell protein. Cells grown in the same medium with 0.4 M NaCl added, synthesized approximately 6 times less OPGs (5 μg).

Using a procedure very similar to that developed for the isolation of an *E. coli* mutant, *mdoC*, deficient in the succinyl substitution of OPGs [30], a mutant (NFB4000) with non acidic OPG (see below) was obtained from strain WS8. In short, OPGs extracted from clones obtained after transposon Tn5TpMCS mutagenesis, were tested by thin layer chromatographic analysis (Cogez, V., Puskas, A., Kaplan, S. & Bohin, J.-P., unpublished work). This mutant strain synthesized the same amounts of OPGs as the parental strain when grown in LOS medium in absence or presence of 0.4 M NaCl (data not shown).

Gas liquid chromatography analysis of the reduced glucans after methanolysis and silylation reactions revealed that glucose could account for all the carbohydrate present and revealed an absence of detectable reducing glucose within the preparation (data not shown).

The osmoregulated periplasmic glucans of *R. sphaeroides* contains 18 glucose residues and is highly substituted by succinyl and acetyl residues. Native OPGs purified from strains WS8 and NFB4000 were subjected to a MALDI mass spectrometric analysis using a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix in positive mode. The spectra obtained with the NFB4000 OPGs showed a high signal to noise ratio (S/N; Fig. 1B), whereas the S/N ratio was not sufficient to interpret the spectra obtained with the WS8 OPGs (data not shown). Therefore, the matrix 3-aminoquinoline, previously found to be superior for analysis of acidic oligosaccharides [24], was used in positive mode in order to obtain quasimolecular ions of

WS8 OPGs (Fig. 1A). Consequently, OPGs of *R. sphaeroides* are probably highly substituted with acidic substituents, and OPGs of the mutant strain NFB4000 are neutral as expected from the screening procedure.

¹H NMR analysis confirmed the fact that the glucans produced by the wild-type strain contain a high level of succinate with the presence of two prominent signals between 2.6 and 2.8 ppm (Fig. 2). These signals correspond unambiguously to the methylene protons of succinate. Furthermore, the signals between 4.3 and 4.6 ppm were attributed to H-6 and H-6', respectively, of glucose residues having succinate linked at C-6 via an ester bond [31]. However, the presence of acetyl substituents was hardly detected.

To obtain the confirmation of acetyl substitution, OPGs were extracted from strains WS8 and NFB4000 and purified to a lesser extent but in a way expected not to alter the chemical composition of the samples (see Materials and Methods). ¹H NMR analysis of these extracts confirmed the fact that strain NFB4000 is unable to transfer succinyl groups to the glucan backbone since signals between 2.6 and 2.8 ppm were missing (Fig. 3). Furthermore, the signal observed at 2.2 ppm confirms the acetyl substitution of the OPGs extracted from this mutant strain (Fig. 3). Phosphoryl substituents were not detected on the osmoregulated periplasmic glucans of *R. sphaeroides* by ³¹P NMR spectroscopy (data not shown), as well by a compositional analysis.

The glucan preparations from both strains were subjected to a mild alkali treatment and then analyzed by MALDI-MS (Fig. 1C and 1D). Spectra obtained in both cases were identical, indicating that the mutation present in strain NFB4000 does not affect the glucan backbone synthesis. Moreover, this analysis revealed the presence of one quasimolecular ion at m/z 2941.4 which agrees with the calculated mass for an $[M + Na]^+$ ion based on an unsubstituted 18-member cyclic glucan. The glucan produced seems to be mostly homogeneous in size, and

only minor species corresponding to cyclic glucans composed of 16, 17, 19, 21, 22, 23, and 24 glucose residues are also present (Fig. 1C and 1D). Moreover, because all the substituted glucans were converted to unsubstituted ones after this alkaline treatment, the succinyl and the acetyl residues must be O-ester linked.

Detailed analysis of the native wild-type glucans revealed the presence of eight sodium-cationized molecular ions, $[M+Na]^+$, at m/z 2941.2, 3042.0, 3141.4, 3241.4, 3341.5, 3441.8, 3541.4, and 3641.6 respectively. These molecular ion species have the same masses as would be expected for cyclic glucans composed of 18 glucose residues with zero to seven succinyl residues (Table 1). Some of these glucans could also be substituted by one to two acetyl residues (Table 1). For example, molecular ions at 3383.6 and 3426.0 have masses corresponding to 18-member cyclic glucans substituted by four succinyl residues with the addition of one and two acetyl residues, respectively.

This analysis for the glucans of strain NFB4000 revealed the presence of five sodium-cationized molecular ions, $[M+Na]^+$, at m/z 2941.2, 2983.3, 3025.9, 3067.7, and 3109.8 respectively. These molecular ion species have identical masses to those expected for cyclic glucans composed of 18 glucose residues with the addition of zero to four acetyl residues. Others sodium-cationized molecular ions at m/z 3103.5, 3145.8, 3188.0, and 3230.4, could correspond to cyclic glucans composed of 19 glucose residues with the addition of zero to three acetyl residues. Thus, acetyl substitution of the OPGs seems to be higher in the mutant strain than in the wild-type. This could reflect a competition between acetyl and succinyl substitution. However, one should also consider the possibility that signals corresponding to the minor species of OPGs observed in the mutant strain are present in the wild-type spectra but masked by noise.

High-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection analysis. In order to obtain a homogeneous batch of cyclic 18-member glucans, the KOH treated glucans were analyzed by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection on a CarboPac PA-100 column. The chromatogram revealed the presence of a major peak with retention times of 36 min (data not shown). Others compounds correspond most probably to the others cyclic glucans observed by MALDI-MS. Further purification of the glucan was performed under the same condition but with a CarboPac PA-1 preparative column, and the main peak was collected, desalted, lyophilized, and used for structure determination.

Methylation analysis. Purified glucans were methylated, methanolized, and after acetylation, subjected to GLC-MS analysis. Methylation analysis showed the presence of 3,4,6-trimethyl Glc, and 2,3,4-trimethyl Glc in the ratio 17.6:1. These results indicated that the cyclic glucans contain one 1,6-linked glucosyl residue whereas all other glucose units are joined by 1,2-glycosidic linkages. The absence of non reducing terminal glucose residue furthermore suggests that these glucans have no branch point.

NMR analysis of the osmoregulated periplasmic glucan of *R. sphaeroides*. The ^1H NMR spectrum (Fig. 4) indicate that the glucan is homogeneous. All 18 anomeric resonances can be distinguished, and we label them from **a** to **r** in decreasing order of their chemical shift. The presence of a doublet signal at 5.197 ppm with a small coupling constant $J_{1,2}$ of 3.3 Hz indicates the α -anomeric configuration of the glucose residue **a**. The other 17 anomeric signals are split by a coupling constant $J_{1,2}$ larger than 7.6 Hz, indicating the β -anomeric configuration of the glucose residues **b** to **r**. The COSY spectrum led to the assignment of the H_2 proton of each glucose residues as listed in Table 2. Due to severe overlaps, it was impossible to extract without any ambiguities others protons assignments.

Correlating ^1H and ^{13}C frequencies in a HSQC spectrum with high resolution in both dimensions (Fig. 5), we noticed good dispersion of the C_2 resonances, that spread out over more than 5 ppm. This dispersion, similar to the one observed for the β -1,2 linkages in *X. campestris* and *R. solanacearum*, is extremely useful upon correlating the C_2 frequency to the H_1 frequency in a HSQC-TOCSY experiment (Fig. 5). All C_2 carbon could be assigned to the **a-r** monomers in this fashion.

Sequence specific assignments are typically based on the long range ^3J coupling constants over the glycosidic linkage, or on the short NOE contacts between flanking protons. Previously, we have shown that these latter distances can be as short as 2.1Å in the 13 membered macrocycle of *R. solanacearum* [32], and allow therefore a rapid transfer of magnetization between flanking residues in a NOE experiment. In addition, the good ^{13}C dispersion and the strong NOEs can be used advantageously to separate the NOE signals in a HSQC-NOESY experiment (data not shown). However, taking profit of the individual anomeric signals, we figured that combining NOESY and TOCSY relays in a NOTO or TONO experiment [33] should be sufficient to read the assignment on the anomeric proton region. If two units **a** and **b** are linked by a β -1,2 linkage ($\text{C}_{1\text{a}}\text{-O-C}_{2\text{b}}$), the $\text{H}_{1\text{b}}$ proton labeled during the t_1 period of the TONO experiment will transfer its magnetization by a short z-TOCSY relay (40ms) to its $\text{H}_{2\text{b}}$ proton. The NOESY period (300 ms) allowing the magnetization transfer to the $\text{H}_{1\text{a}}$ proton, this latter will be detected during the t_2 observation time, resulting in a cross peak connecting the ($\text{H}_{1\text{b}}, \text{H}_{1\text{a}}$) frequencies in (ω_1, ω_2). In the NOTO experiment, we will detect the symmetric peak between ($\text{H}_{1\text{a}}, \text{H}_{1\text{b}}$) in (ω_1, ω_2), because the NOESY transfer precedes the TOCSY relay. It can easily be seen from Fig. 6A and 6B that complete relay can be established along the β -1,2 linked glucose units, leading to the full assignment of the cyclic OPG (Fig. 7).

The presence of the α -1,6 linkage in the glucan produces several distinct chemical shift effects. The residue **i** does not bear a glucosyl substituent at O₂ and consequently its H₂ resonance ($\delta = 3.330$ ppm) is shifted significantly upfield relative to the H₂ resonances of the other 17 glucose residue. ($\delta = 3.510$ to 3.763 ppm). Glucose residue **r** is glycosidically linked to O₂ of the residue **a**, which is in α - configuration, rather than to a residue in β - configuration, and so its H₁ resonance ($\delta = 4.657$ ppm) is upfield relative to the other β - anomeric resonances ($\delta = 4.799$ to 5.021 ppm). In the same manner, the upfield shifted C₃ and C₅ of the residue **a** confirm the α -anomeric configuration of this residue. Whereas all C₂ and C₆ resonances fall in the range of 81.1 to 86 ppm and 61.7 to 62.3 ppm respectively, residue **i** has a characteristic upfield shifted C₂ and a significantly downfield-shifted C₆ ($\delta\delta = \sim 7$ ppm). This indicates that this residue has a free OH group at the C₂ position and an OH group at the C₆ position engaged in a glycosidic linkage. Finally, the absence of any cross peaks with carbon frequencies between 92 and 96 ppm in the HSQC spectra, corresponding to C₁ of a reducing glucose residue, confirms the cyclic nature of the glucan.

DISCUSSION

The present study describes the structures of OPGs from cells of *R. sphaeroides*, and demonstrates that (i) they are mostly homogeneous in size (18 glucose units per ring for the predominant form), (ii) they are linked by β -1,2 linkages and one α -1,6 linkage, and (iii) they are highly substituted by succinyl and acetyl residues. They also exhibit some degree of structural rigidity as demonstrated by the distinct chemical shifts values of all anomeric protons. They are very similar to the previously described OPGs of *R. solanacearum* and

X. campestris, which are different in their size (13 and 16 glucose units per ring), their higher homogeneity and their absence of substituents.

Therefore, we can conclude that cyclic α -1,6; β -1,2 cyclic glucans are synthesized by bacteria belonging to three different subdivisions of the *Proteobacteria*: α for *R. sphaeroides*, β for *R. solanacearum*, and γ for *X. campestris*. This opens the question of the genes governing the biosynthesis of these molecules. Two possibilities can be considered : orthologous genes, implicated in the synthesis of similar glucan structures, are present in 3 different subdivisions of the *Proteobacteria*, or different genes evolved in each subdivision and functionally converged. Actually, OPG biosynthetic genes have been described for bacteria of the alpha and gamma subdivision. These genes are highly conserved within each of these subdivisions ([6, 12, 34]; Page, F., Altabe, S.G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J.-M., Robert-Baudouy, J. & Bohin, J.-P., unpublished work) but no conservation was observed when genes of the alpha subdivision were compared to genes of the gamma subdivision [6]. Genome sequencing of *R. sphaeroides* is an ongoing project (*Rhodobacter sphaeroides* Website: <http://utmmg.med.uth.tmc.edu/sphaeroides>) and identification of OPG genes should be fast. Then, it will be possible to know to what extent these genes are related to the *ndvB* family of genes found in the α subdivision or to the *mdoGH* family of genes found in the γ subdivision, or if *R. sphaeroides* genes defined a new gene family.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Anne Bohin for help in glucan purification and Yves Leroy for the GLC-MS analyses. This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, and by the

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR8576 and UMR8525). It was performed as a collaborative effort of the Laboratoire Européen Associé "Analyse structure-fonction des biomolécules : approche multidisciplinaire" (CNRS, France-FNRS, Belgium).

REFERENCES

1. Bohin, J.-P. (2000) Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 11-19.
2. Geremia, R.A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. & Ugalde, R.A. (1987) A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1,2) glucans. *J. Bacteriol.* **169**, 880-884.
3. Bhagwat, A.A. & Keister, D.L. (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.
4. Puvanesarajah, V., Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J. & Nester, E.W. (1985) Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**, 102-106.
5. Mukhopadhyay, P., Williams, J. & Mills, D. (1988) Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **170**, 5479-5488.
6. Loubens I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J.-M. & Bohin, J.-P. (1993) Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**, 329-340.
7. Kennedy, E.P. (1996) Membrane derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn. (Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B.,

Maganasik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. & Umbarger, H.E., eds.), pp. 1064-1074., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

8. Talaga, P., Fournet, B. & Bohin, J.-P. (1994) Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**, 6538-6544.
9. Schneider, J.E., Reinhold, V., Rumley, M.K. & Kennedy, E.P. (1979) Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 10135-10138.
10. Hisamatsu, M. (1992) Cyclic (1,2)- β -D-glucan (cyclosophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**, 137-146.
11. Bundle, M.W., Cherwonogrodzky, K.W. & Perry, M.B. (1988) Characterization of *Brucella* polysaccharide. *J. Infect. Immun.* **56**, 1101-1106.
12. Breedveld, M.W. & Miller, K.J. (1994) Cyclic β -glucans of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**, 145-161.
13. Hisamatsu, M., Yamada, T., Higashiura, T. & Ikeda, M. (1987). The production of acidic, o-acylated cyclosophorans [cyclic (1,2)- β -D-glucans] by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**, 115-122.
14. Miller, K.J., Gore, R.S. & Benesi, A. J. (1988) Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**, 4569-4575.
15. Rolin, D.B., Pfeffer, P.E., Osman, S.F., Szwergold, B.S., Kappler, F. & Benesi, A.J. (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.

16. Miller, K.J., Gore, R.S., Johnson, R., Benesi, A.J. & Reinhold, V.N. (1990) Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **172**, 136-142.
17. Altabe, S.G., Talaga, P., Wieruszkeski, J.-M., Lippens, G., Ugalde, R. & Bohin, J.-P. (1998) Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*. In *Biological nitrogen fixation for the 21st century* (Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W. E. eds.), p. 390., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
18. Talaga, P., Stahl, B., Wieruszkeski, J.-M., Hillenkamp, F., Tsuyumu, S., Lippens, G. & Bohin, J.-P. (1996) Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. citri. *J. Bacteriol.* **178**, 2263-2271.
19. York, W. S. 1995. A conformational analysis for cyclic β -(1-2)-linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**:205-222.
20. Olsen, G.J., Woese, C.R. & Overbeek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**, 1-6.
21. Zeilstra-Ryalls J., Gomelsky, M., Eraso, J.M., Yeliseev, A., O'Gara, J. & Kaplan, S. (1998) Control of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **180**, 2801-2809.
22. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K. & Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* **28**, 350-356.
23. Stahl, B., Steup, M., Karas, M. & Hillenkamp, F. (1991) Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **63**, 1463-1466.

24. Stahl, B., Thurl, S., Zeng, J., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M. & Sawatzki, G. (1994) Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **223**, 218-226.
25. Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. & Ricard, G. (1984) A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47.
26. Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* **116**, 489-502.
27. Lippens, G., Wieruszkeski, J.-M., Talaga, P. & Bohin, J.-P. (1996) Measurement of three-bond coupling constants in the osmoregulated periplasmic glucans of *Burkholderia solanacearum*. *J. Biomol. NMR* **8**, 311-318.
28. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
29. Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. & Strecker, G. (1986) Glycoproteins. In *Carbohydrate analysis: a practical approach* (Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F., eds.), pp. 143-204. IRL Press, Inc., Washington D.C.
30. Lacroix, J.-M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A. & Bohin, J.-P. (1999) The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **181**, 3626-3631.
31. Matulová, M., Toffanin, R., Navarini, L., Gilli, R., Paoletti, S. & Cesàro, A. (1994) NMR analysis of succinoglycans from different microbial sources: partial assignment of their ¹H

- and ^{13}C NMR spectra and location of the succinate and the acetate groups. *Carbohydr. Res.* **265**, 167-179.
32. Lippens, G., Wieruszski, J.-M., Talaga, P., Bohin, J.-P. & Desvaux, H. (1996) Correlation between the chemical-shift values and precise interglycosidic distance measurements in the cyclic glucan of *Burkholderia solanacearum*. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7227-7228.
33. Poppe, L. & Dabrowski, J. (1989) Sequence determination in oligosaccharides by relayed NOE experiments in the rotating frame. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 618-623.
34. Bhagwat, A.A., Gross, K.C., Tully, R.E. & Keister, D. L. (1996) β -glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1 \rightarrow 6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**, 4635-4642.

FIGURES

FIG. 1. Positive ion MALDI mass spectra of the OPGs of *R. sphaeroides* strains WS8 and NFB4000. Native (panels A and B) or alkali treated (panels C and D) OPGs extracted from strains WS8 (panels A and C) and NFB4000 (panels B and D) were analyzed with 3-aminoquinoline (panel A) or 2,5-dihydroxybenzoic acid (panels B to D) as matrix.

FIG. 2. 400 MHz ^1H -NMR analysis of the TCA extracted OPGs of *R. sphaeroides* WS8 (see Materials and Methods for further detail).

FIG. 3. 400 MHz ^1H -NMR analysis of OPGs extracted by ethanol and a single step purification from strains WS8 and NFB4000 (see Materials and Methods for further detail).

FIG. 4. 600-MHz ^1H NMR spectra of alkali treated and purified OPGs. Above is an expansion of the anomeric region.

FIG. 5. ^1H - ^{13}C correlation spectrum with annotated anomeric and C_2 carbon resonances. In boxed inserts, the TOCSY relays observed in the corresponding HSQC-TOCSY spectrum allow to connect C_1 and C_2 positions in the same residue. Unit **i** is linked in α -1,6 resulting in the (**i**H₁, **i**C₂) correlation at 4.88 and 74.92 ppm.

FIG. 6. Homonuclear NOTO and TONO anomeric spectral zones showing the asymmetric connectivities between the β -1,2 linked glucose units.

FIG. 7. Primary sequences of the OPG of *R. sphaeroides* WS8. Lowercase letters denote the units in the NMR experiments.

TABLE 1. MALDI-MS analysis of the osmoregulated periplasmic glucans of *R. sphaeroides* WS8.

Measured masses [M + Na] ⁺¹	Calculated substituents present on the 18-member cyclic glucan	
	Number of succinyl residues	Number of acetyl residues
2941.2	0	0
3042.0	1	0
3141.4	2	0
3241.4	3	0
3283.2	3	1
3341.5	4	0
3383.6	4	1
3426.1	4	2
3441.8	5	0
3483.8	5	1
3426.0	5	2
3541.4	6	0
3583.5	6	1
3641.6	7	0

¹ The MALDI-TOF instrument was calibrated using the chemical masses of the peptide standards: substance P (1348.7 [M+H⁺]) and bovine insulin (5748.6 [M+H⁺]).

TABLE 2. Proton chemical shifts of the osmoregulated periplasmic glucan of *R. sphaeroides* WS8^a

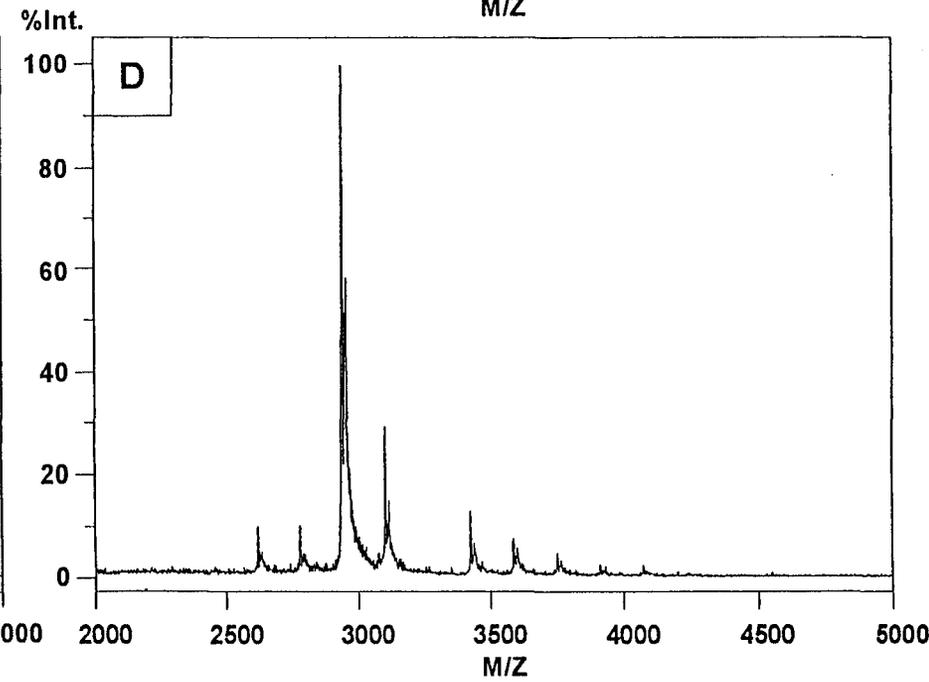
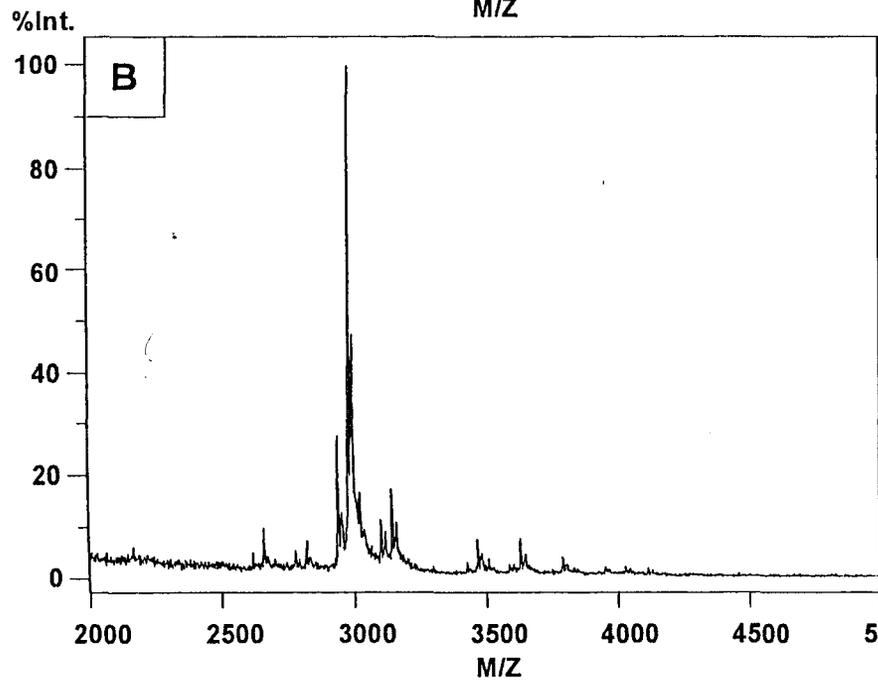
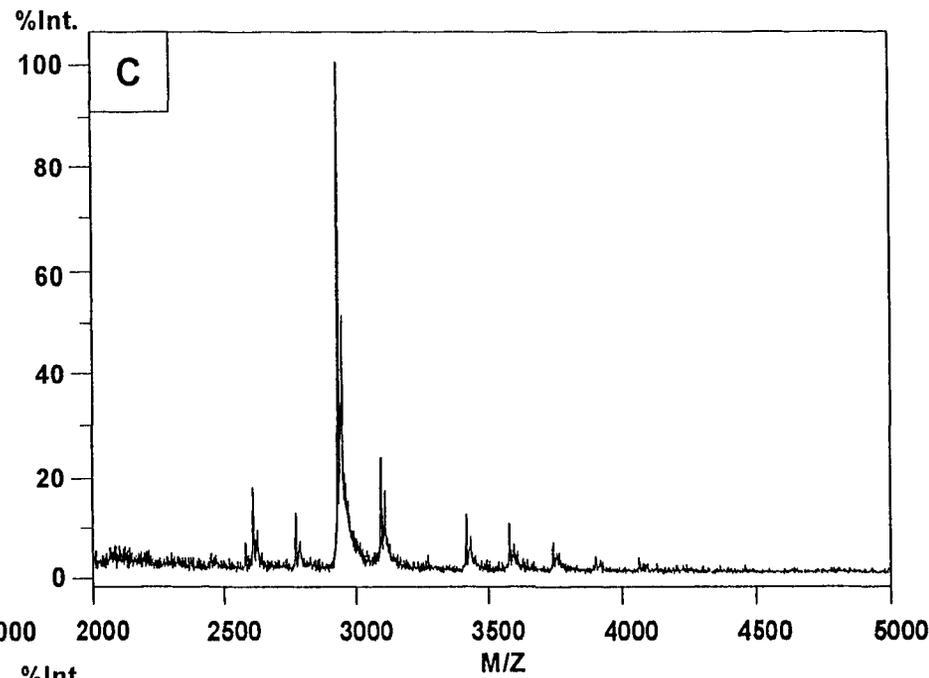
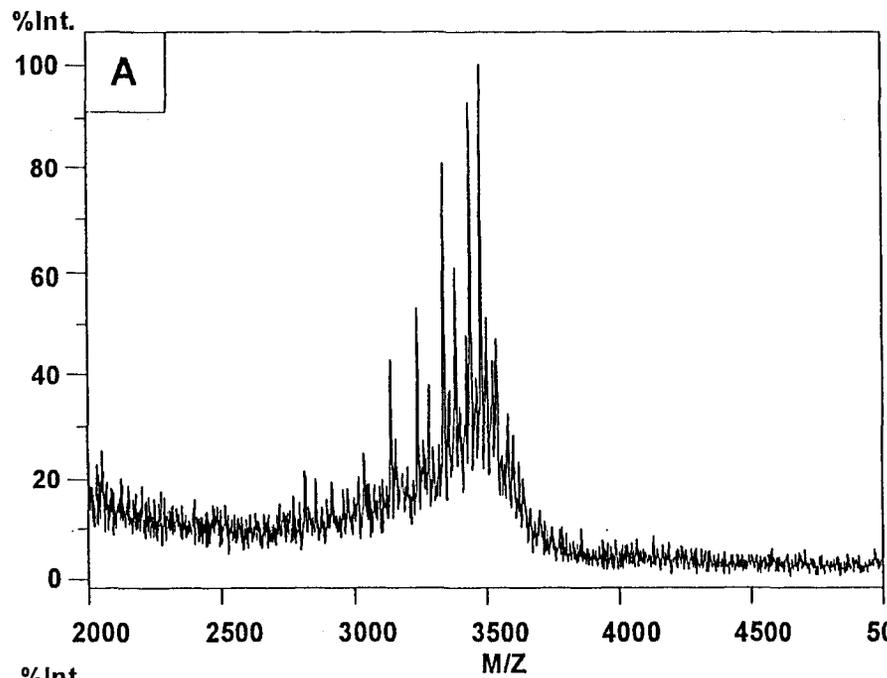
Residue	proton						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
a	5.197	3.621	3.947	3.534	3.711	3.880	3.786
b	5.021	3.521	3.759	3.492	3.517	3.958	N.D.
c	4.992	3.538	3.767	3.464	3.513	3.962	N.D.
d	4.986	3.539	3.782	3.461	3.509	3.960	N.D.
e	4.977	3.510	3.758	3.481	3.512	3.968	N.D.
f	4.927	3.515	3.761	3.503	3.517	3.955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

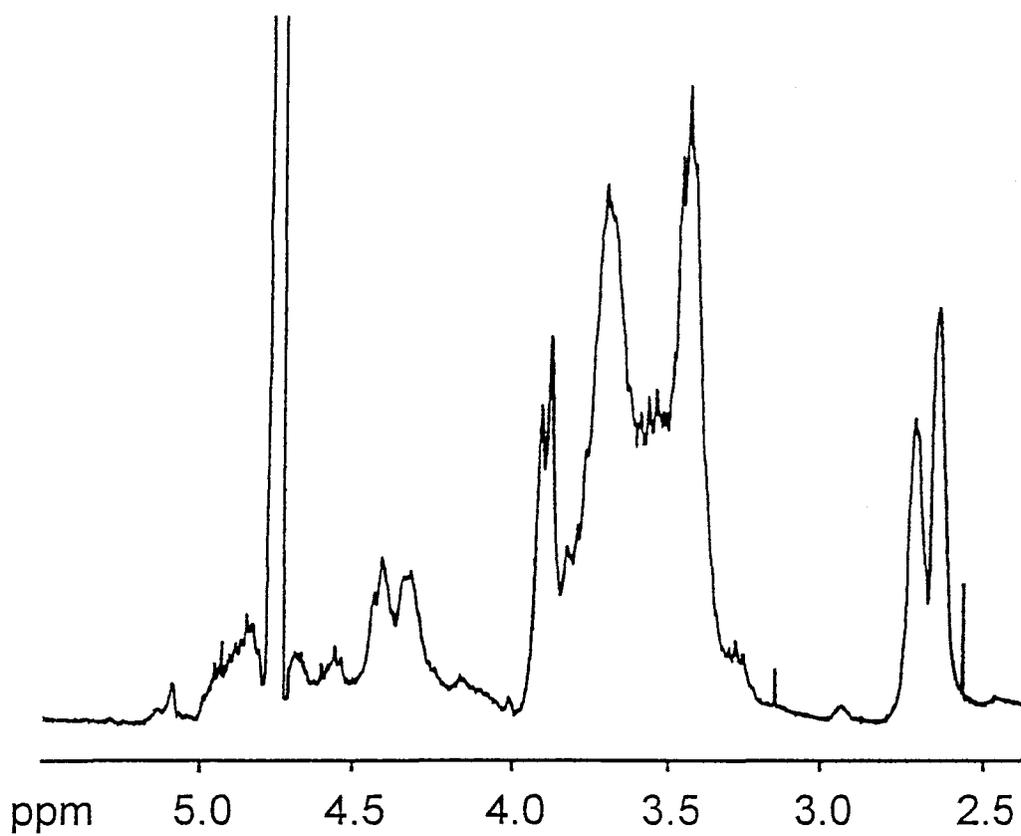
^a Chemical shifts in ppm relative to acetone as internal reference. N.D., not determined with accuracy.

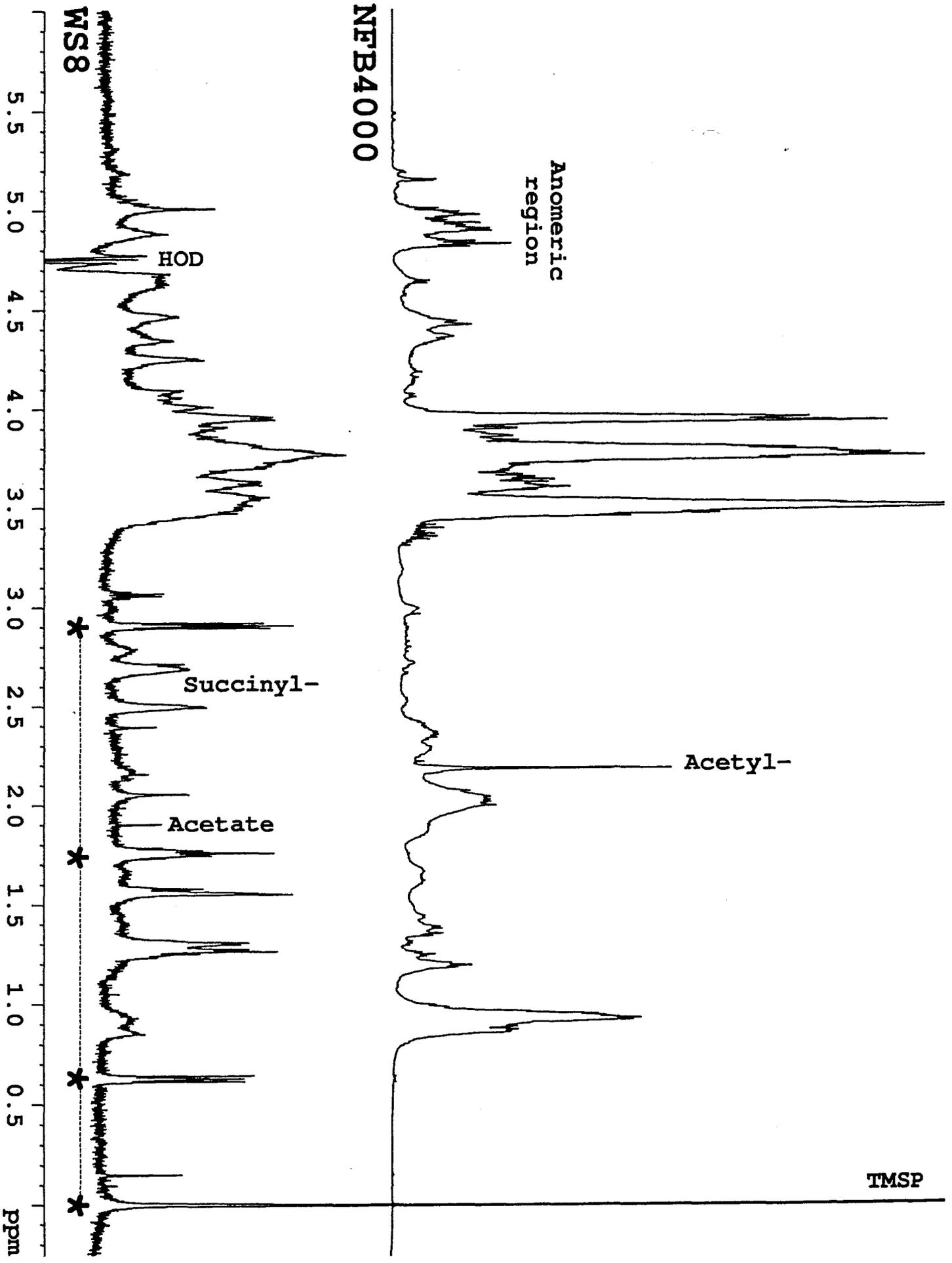
TABLE 3. Carbon chemical shifts of the osmoregulated periplasmic glucan of *R. sphaeroides* WS8^a

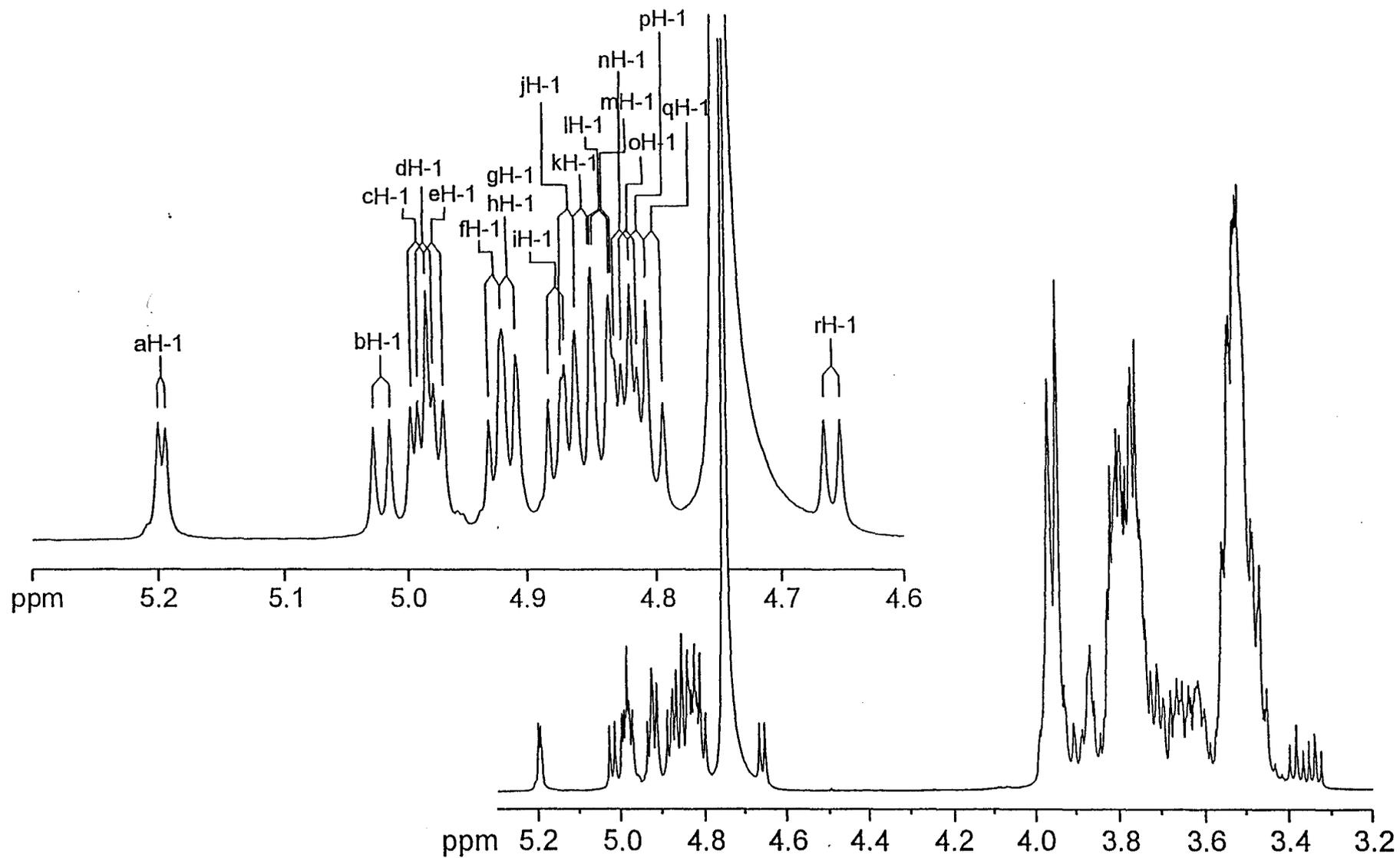
Residue	Carbon					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
a	99.53	83.55	73.02	70.21	73.16	61.70
b	102.67	85.06	76.24	70.27	77.55	62.12
c	102.67	84.90	76.41	70.22	77.55	62.07
d	102.68	84.92	76.41	70.21	77.70	62.11
e	102.49	85.29	76.33	70.20	77.54	62.08
f	103.21	85.41	76.44	70.15	77.37	62.10
g	103.14	82.75	76.92	70.17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

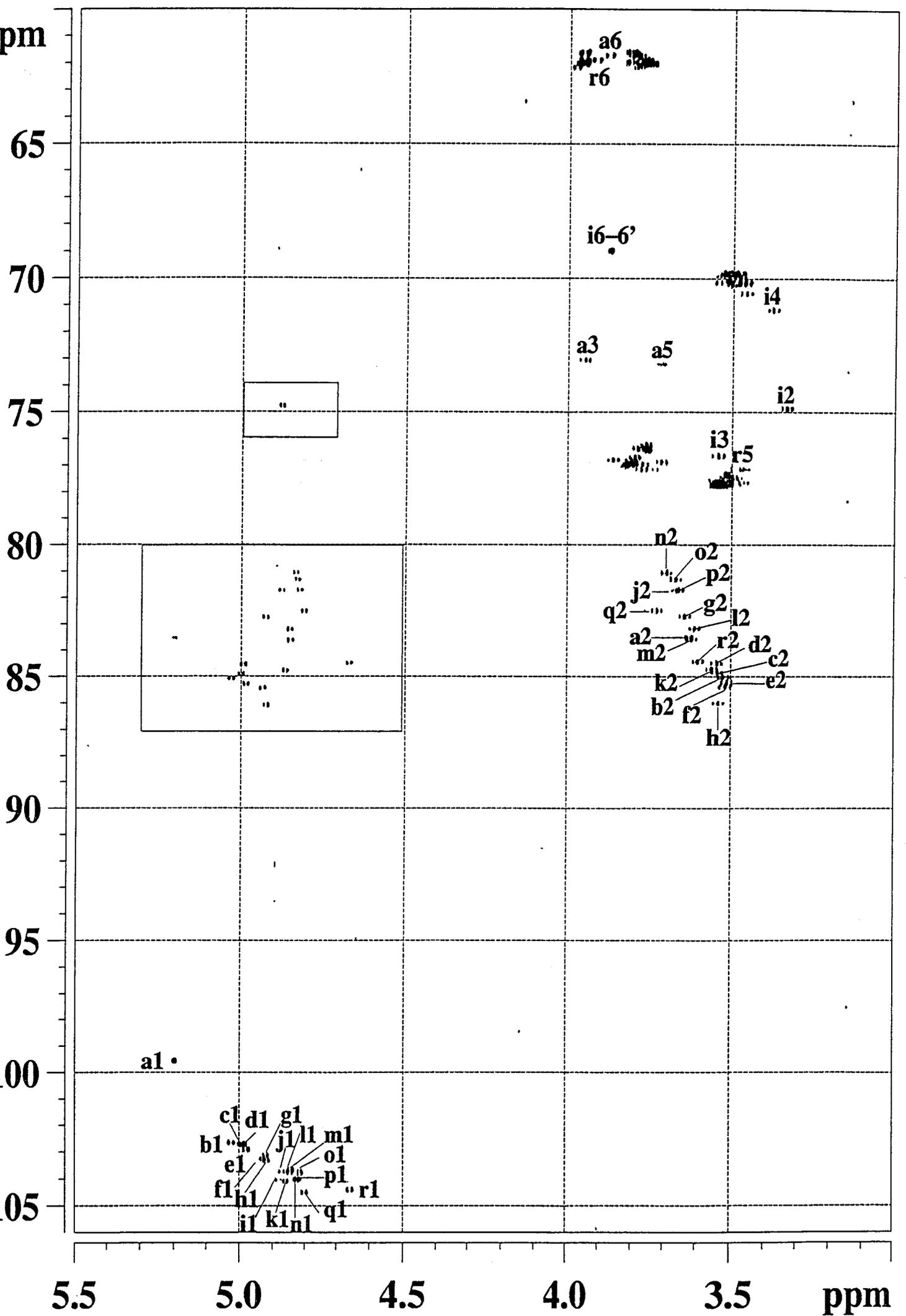
^a Chemical shifts in ppm relative to acetone as internal reference



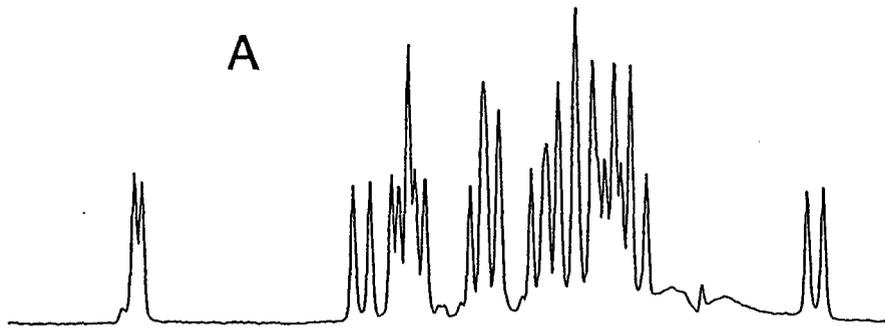




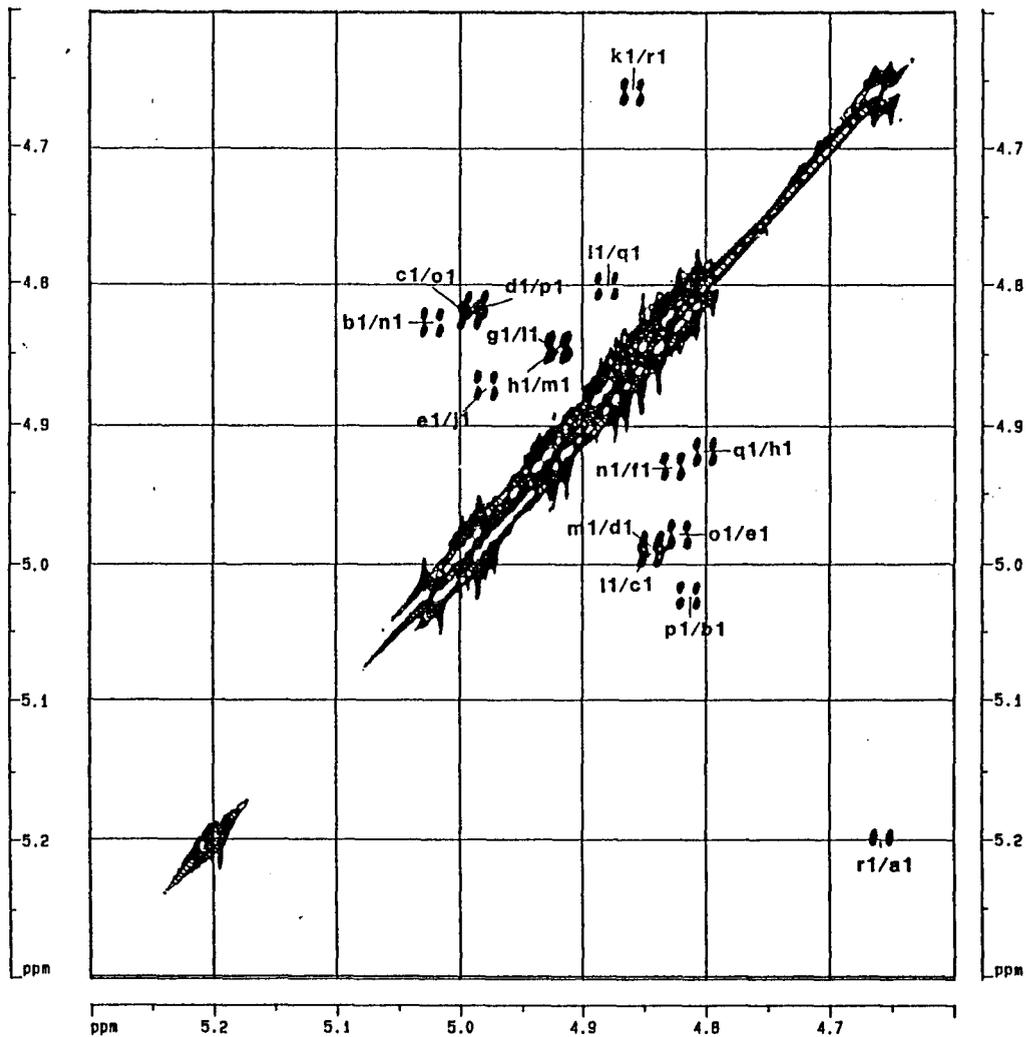
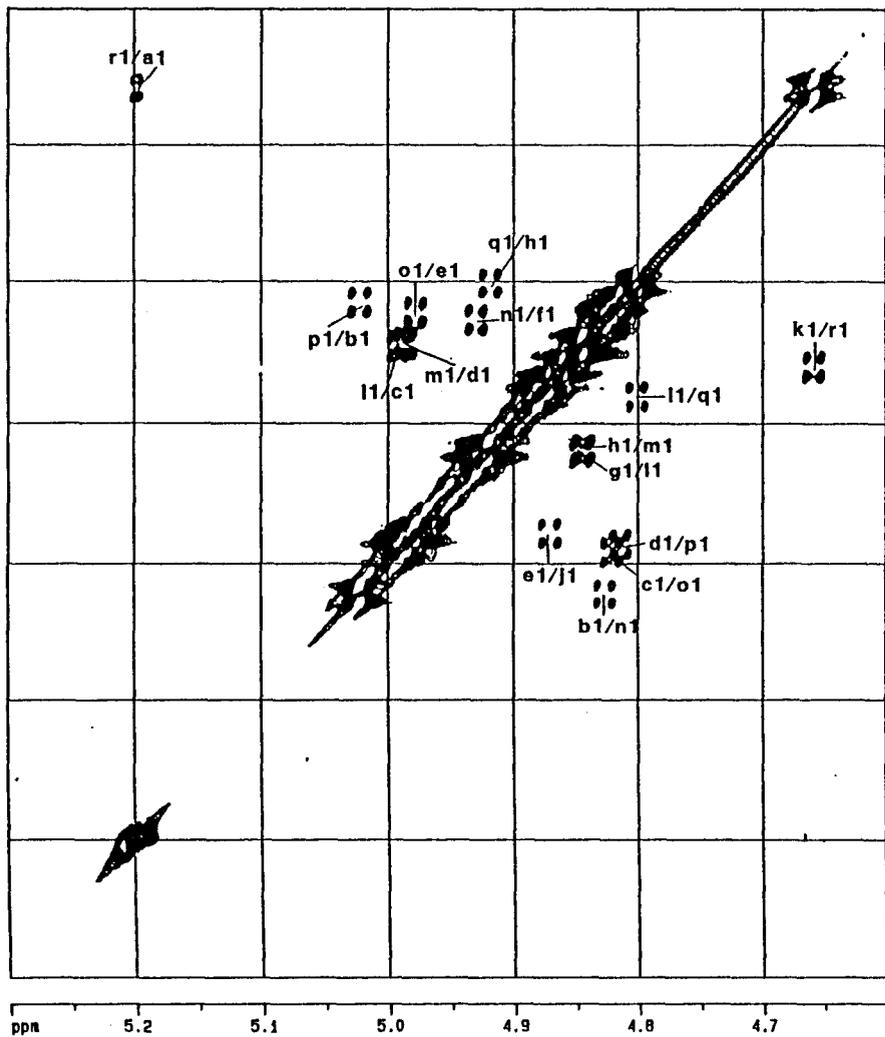
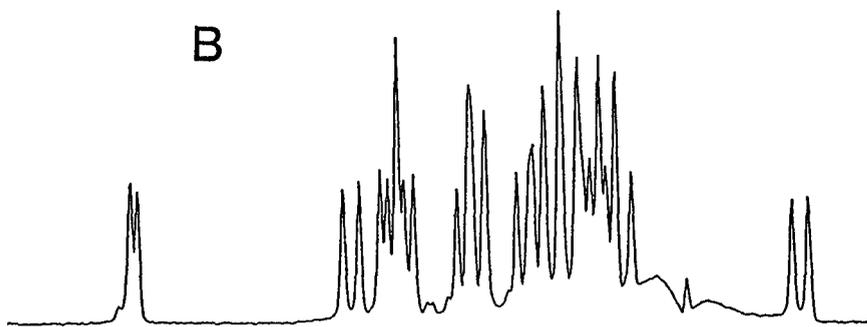


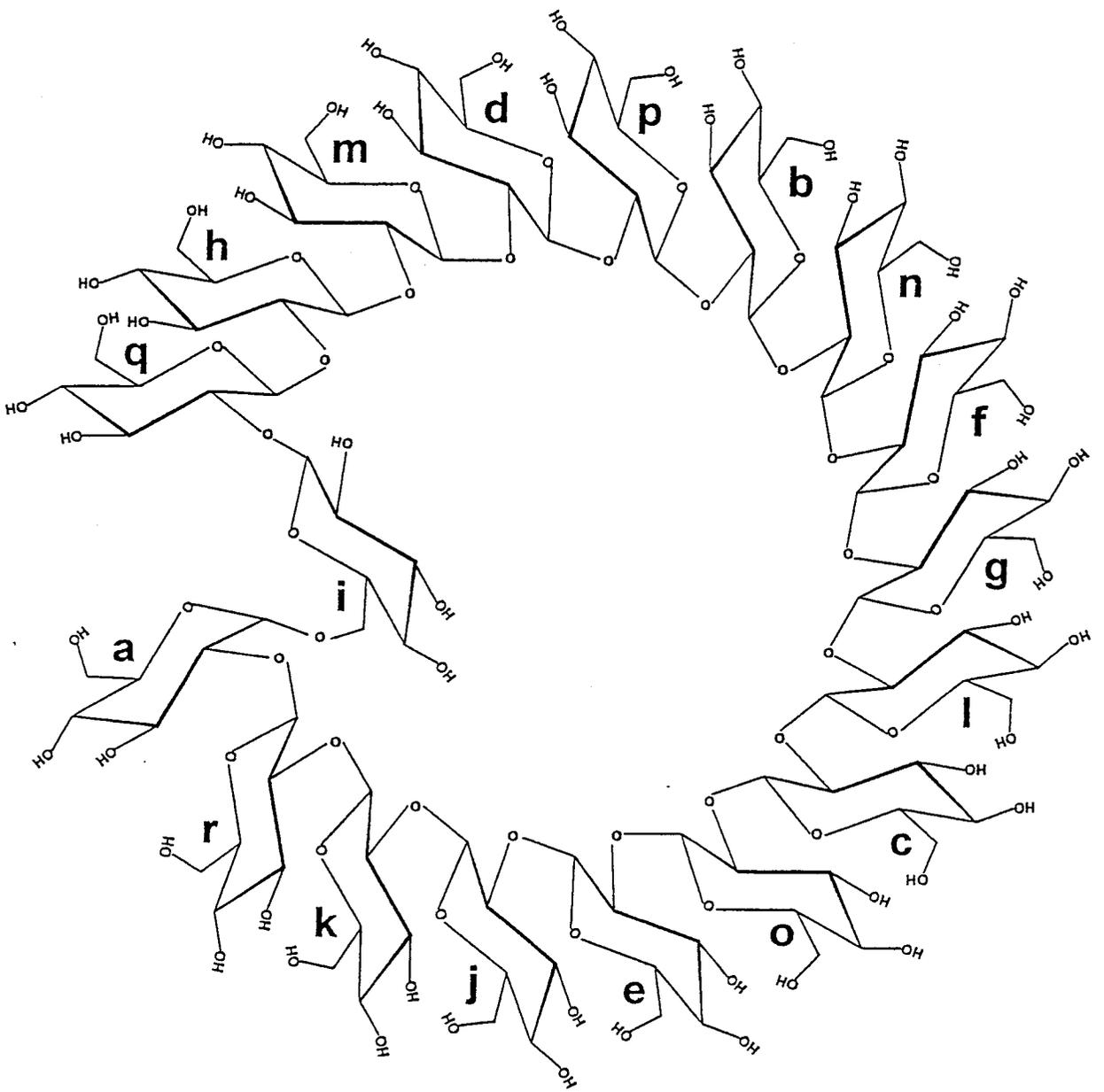


A



B





OPG production in *Rhodobacter sphaeroides*: Analysis of the structure and function of
the *opgA* locus

Agnes Puskas¹, Virginie Coge², Eugene Gak¹, Jean-Pierre Bohin² and Samuel Kaplan^{1*}

Department of Microbiology and Molecular Genetics, The University of Texas Health
Science Center-Houston, Houston, Texas 77225,¹ and Laboratoire de Chimie Biologique,
CNRS UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve
d'Ascq Cedex, France²

Running title: *opg* genes in *Rhodobacter sphaeroides*

Send correspondence to: Samuel Kaplan
Department of Microbiology and Molecular Genetics
The University of Texas Health Science Center-Houston
Houston, Texas 77030
Phone: 713 500 5502
FAX: 713 500 5499
Email: Samuel.Kaplan@uth.tmc.edu

ABSTRACT

Quorum sensing mediated by homoserine lactone derivatives (autoinducers) is a form of gene regulation in Gram-negative bacteria, often associated with host-microbe interaction. Although it has no obvious interacting partner, *Rhodobacter sphaeroides* possesses an autoinductive regulatory system. Inactivation of *cerI*, the gene responsible for autoinducer (AI) synthesis in *R. sphaeroides* leads to an overproduction of exopolysaccharides. Sequence analysis downstream of *cerI* revealed the presence of two genes, homologous to *mdoG* and *mdoH*: the genes governing the osmoregulated periplasmic glucan (OPG) synthesis in *Escherichia coli*. The position of these homologues and the phenotype of the AI⁻ mutant suggested a possible relationship between the two systems. In this paper we describe the two genes (*opgG* and *opgH*), and provide evidence of their participation in OPG synthesis in *R. sphaeroides* 2.4.1. We also demonstrate, that these genes are not responsible for the increased exopolysaccharide production of the *R. sphaeroides* AI⁻ mutant.

INTRODUCTION

Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. belongs to the α -3 subdivision of the *Proteobacteria*, and like many members it possesses a complex genome. Two, circular chromosomes (large/CI: 3.0 Mbp; small/CII: 0.9 Mbp) and five additional endogenous replicons provide the genetic background for the physiologic versatility of this free-living, photoheterotrophic bacterium (Fornari et al., 1984). Although no interactive partner is known, *R. sphaeroides* possesses an autoinductive regulatory system, which is often associated with a shared lifestyle. It is also worth noting that a number of genetic elements have been identified by DNA sequencing analysis of *R. sphaeroides* CII which show excellent sequence homologies to genes of the rhizobia and agrobacter and which encode proteins involved in the establishment of the cooperative lifestyle in these organisms. To learn more of the role of the AI system in *Rhodobacter sphaeroides*, we have begun a search for genes under the control of this regulon. We do know that inactivation of the *cerI* gene results in an overproduction of exopolysaccharide (Puskas et al., 1997). This observation suggests the presence of a biosynthetic pathway normally repressed by the AI system in the wild type. Although exopolysaccharide (EP) production of the plant pathogen *Erwinia stewartii* was previously demonstrated to be under autoinductive control, in the case of this bacterium, regulation of the EP is positive (Beck von Bodman and Farrand, 1995).

Osmoregulated periplasmic glucans (OPG) are general compounds of the cell envelope in Gram-negative bacteria. Despite the osmotic balancing function indicated by their name, they were also found to be involved in host-microbe interactions (Geremia et al., 1987; Bhagwat and Keister, 1995.; Puvanesarajah et al., 1985; Mukopadhyay et al., 1988; Loubens et al., 1993). Based upon their chemical structure the OPGs described to date are placed into four groups (Bohin, 2000). Although the type of OPG produced is characteristic for the species, there is no strict correlation between the evolutionary position determined on the basis of 16S rRNA sequence and the structure of the OPG found in the cell envelope. Recent work of Talaga et al. demonstrated that the OPGs of *R. sphaeroides* are similar to those found in *Xanthomonas campestris* (γ subdivision) and *Ralstonia solanacearum* (β subdivision).

The OPG biosynthesis genes described in the *Proteobacteria* form two distinct families: the *ndv/chv* family is found in members of the α -*Proteobacteria*, and the *mdo* genes are found in members of the γ subdivision of the *Proteobacteria* (Bohin, 2000). While members within both families show high level of conservation, there is no significant homology between the two families. In the *Rhizobiaceae* the products of *ndvA/chvA* and *ndvB/chvB* are necessary for OPG biosynthesis in both the rhizobia and agrobacteria, respectively. *ndvA* and *chvA* encode proteins involved in the translocation of the cyclic β -glucans to the periplasm and the extracellular medium, the products of *ndvB* and *chvB* participate in the biosynthesis of the cyclic β -(1,2)-glucan backbone from UDP-glucose (Inon de Iannino et al., 1989; Cangelosi et al., 1989; Zorreguieta and Ugalde, 1986; Ijepi et al., 1990). In *E. coli* the *mdoA* locus consists of the *mdoG* and *mdoH* genes (Bohin and Kennedy, 1984). While the function of the *mdoG* product remains to be determined, *mdoH* encodes a glucosyl-transferase (Loubens et al., 1993; Debarbieux et al., 1997). The product of *mdoB* and *mdoC* are necessary for the substitution of the backbone by phosphoglycerol and succinyl residues, respectively. The function of these two genes is proven to be dispensable in OPG biosynthesis (Jackson, Bohin, Kennedy, 1984, Lacroix et al., 1999). In *R. sphaeroides* the presence of an *ndvB* homologue on the small (CII) chromosome was previously demonstrated (Choudhary et al., 1997) suggesting it to be a member of the *Rhizobiaceae* group. However, downstream of *cerI* (CI) sequence analysis revealed two genes (*opgGH*), homologous to the *mdoGH* of *E. coli*.

The unexpected combination of the OPG synthetic genes together with the *ndvB* homologue raised questions far beyond the origin of increased exopolysaccharide production in the AI⁻ mutants. To answer these questions our first effort has centered on the genes, their sequences and their functionality in *R. sphaeroides*. In this work we describe the genes and provide evidence for their functionality. We also demonstrate, that *opgG* and *opgH* are probably not responsible for the increased exopolysaccharide production of the mutants bearing an inactive AI system.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture conditions and plasmids. Table I contains the list of strains and plasmids used in this study. *R. sphaeroides* strains were grown at 30°C in Siström's succinic acid minimal medium (SIS) (Cohen-Bazire et al., 1956) anaerobically, illuminated at 100W/m². To determine OPG production and osmotic stability, aerobic chemoheterotrophic cultures were grown with shaking on Luria-Bertani broth (LB) (Sambrook et al., 1989), or NaCl-free LB. *E. coli* strains were grown at 37 °C in LB. For plating, media were supplemented with 1.5% agar. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 100µg/ml; kanamycin, 25µg/ml; rifampicin, 100µg/ml; spectinomycin, 50µg/ml; streptomycin, 50µg/ml; tetracycline, 0.8-1.0µg/ml (10µg/ml for *E. coli* strains) and trimethoprim, 50µg/ml.

DNA sequencing and sequence analysis. DNA sequence of the *opg* genes was determined by primer walking and performed at the DNA Core Facility of the Department of Microbiology and Molecular Genetics (University of Texas Health Science Center, Houston, TX), on an ABI 377 automatic DNA sequencer. GIBCO BRL and Integrated DNA Technology synthesized custom primers. pUI8166, pUI2509, pUI2510, pGAK110 and 1G10 served as template for the sequencing reactions (Big Dye terminator sequencing kit, Perkin-Elmer, Applied Biosystem Division, Foster City, Calif.). Assembly and analysis of the DNA sequences was performed using the DNA Strider (Institute de Recherche Fondamentale, Commissariat an l'Energie Atomique, Paris, France) Phred and Phrap (CodonCode Corporation) and GCG (Genetics Computer

Group, Wisconsin Package, Madison, Wis.) software's. SOSUI (Mitaku Group, Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology) and Pfam (Washington University in St. Louis) was used for the analysis of the derived protein sequences.

Inactivation of *orfY*. The 1.2kb *EcoRI-PstI* fragment of pUI2509 was ligated into Litmus 28/ *EcoRI-PstI* (pGAK125). The 278bp *SacII* fragment of pGAK125 was replaced with a Km cassette: a 1.2kb *HincII* fragment of pUC4K. (The cohesive ends were previously filled in with T4 DNA polymerase.) The resulting pGAK229D construct contained the cassette in the same orientation as the *orfY*, while pGAK229R contained the cassette in reverse orientation. The 2.1kb *EcoRI-NotI* fragments of pGAK229D and pGAK229R were subcloned into *EcoRI-NcoI* digested pSUP202 (pGAK230 and pGAK231), and conjugated from *E. coli* S17-1 into *R.sphaeroides* 2.4.1 .

The proper structure of the selected Km^R Tet^S isolates was verified by Southern hybridization of their genomic DNA digests.

Ω StSp disruption of *opgG*. The *BamHI* site on the pBS II SK (+) polylinker was inactivated (fill-in reaction) and the 2.6kb *EcoRI* fragment of pUI2509 was cloned into the modified vector (pUI2511). The Ω StSp cartridge from pHP45 Ω StSp was ligated into the unique *BamHI* site of pUI2511 (pUI2512). The construct containing the target gene which was disrupted 244bp from its predicted start codon was subcloned into pSUP202 as a 4.6kb *EcoRI* fragment (pUI2513). pUI2513 was mobilized from S17-1 into *R.sphaeroides* 2.4.1. The matings were performed on LB plates, and the exconjugants selected on SIS StSp plates. The structure of Tet sensitive isolates was confirmed by Southern hybridization of their genomic DNA digests.

Inactivation of *orfX*. The 2.1kb *Sall* fragment of 1G10 containing *opgG orfX* and *opgH* was cloned into pUC19 (pGAK114). The Km cartridge excised from pUC4K as a 1.2kb *Sall* fragment was ligated in both orientations into the *XhoI* site of pGAK114 (pGAK116D and pGAK116R). The resulting constructs excised as a 3.8kb *AatIII-Eco47III* fragments were ligated into *ScaI-AatIII* digested pSUP202 Δ (pGAK118 and pGAK119), and conjugated from S17-1 into *R. sphaeroides* 2.4.1 as described above. The structure of the Km^r Tet^s exconjugants was confirmed by Southern hybridization. The mutants contain *orfX* disrupted at 39bps from the predicted start codon.

Inactivation of *opgH*. The 2.2kb *EcoRV-BglIII* fragment of pGAK110 (*opgH*) was ligated into Litmus 28 (pGAK115). The Km cartridge was isolated as a 1.2kb *Sall* fragment from pUC4K and was ligated into the *Sall* site of pGAK115 in both orientations (pGAK117D and pGAK117R). The constructs contain *opgH* disrupted at 609 basepairs from the predicted start codon. The 3.5kb *EcoRV-SnaBI* fragments from pGAK117D and pGAK117R were ligated into *ScaI* digested pSUP202 Δ (pGAK120 and pGAK121), and mobilized into *R. sphaeroides* 2.4.1 from the S17-1 donor. The correct position of the cartridges in the mutants was confirmed by Southern hybridization of their genomic DNA digests.

Isolation of OpgG⁻ CerI double mutants. pUI2506 (Puskas et al., 1997) containing *cerI* disrupted 149 basepairs from its start codon by a Ω Km cartridge was conjugated into the *opgG⁻* mutant AP5. The exconjugants resistant to both StSp and Km were tested for Tet sensitivity and AI production.

Isolation of OpgH⁻ CerI double mutants. The trimethoprim cassette was isolated as a 2.8kb *HindIII* fragment from pUI1680. After filling the cohesive ends (Klenow

polymerase) the cassette was ligated into the *SmaI* site of pGAK120 (pGAK138). The construct was conjugated into the *cerT* mutant AP3 from S17-1. The structure of the double mutants was confirmed by Southern hybridization.

Isolation, quantitative and qualitative analysis of OPGs. *R. sphaeroides* was grown overnight in 50 ml NaCl-free LB, and harvested by centrifugation (4 °C, 8000 x g, 15 min). The cell pellet was resuspended in 5 ml distilled water and extracted with two volumes of ethanol. The organic phase was heated for 30 min at 70 °C, and centrifuged (4 °C, 15000 x g, 15 min). The supernatant containing the OPGs was concentrated by rotary evaporation, and the 1 ml concentrate was fractionated by gel filtration (Bio-Gel P-4, BioRad). The column (55 x 1.6 cm) was equilibrated with 0.5 % acetic acid, and eluted with the same buffer at a flow rate of 15 ml/hr. 1.5 ml fractions were collected, and the sugar content of each fraction was determined colorimetrically, using the anthrone reagent procedure (Spiro, R.G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. Methods Enzymol. 8:3-26) OPGs were eluted as single peaks absent in extracts of *Opg⁻* strains (Talaga et al).

GenBank accession number. The nucleotide sequence shown in Figure 2 has been deposited in GenBank under accession no. AF016298.

RESULTS

opg genes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1

An *orf*, located 800 bp downstream of the stop codon of *cerI* showed significant homology to the *mdoG* gene of *E. coli* (Fig.1, Fig.2). The size of the predicted gene product is in good agreement with that of its *E.coli* homologue: 509 and 511 amino acids respectively (Fig.3). Their amino acid sequences are 40% identical with 58% similarity. Considering the probable role of the gene product we designated the *orf* “*opgG*”. The predicted OpgG would be a soluble protein, like MdoG (SOSUI). Neither protein contains any known protein domains which would suggest their function.

203 bp downstream of the stop codon of *opgG*, a second *orf* was identified as a homologue of the *E. coli mdoH* gene. However, the predicted gene product of the *R. sphaeroides* gene (*opgH*) is significantly shorter: only 595 amino acids, while *mdoH* codes an 847 amino acids protein. The two amino acid sequences are 37% identical with 53% similarity. In this instance the search for conserved protein sequences or domains (Pfam) revealed a characteristic glycosyl transferase domain from amino acid 92→273, with a very high probability (E-value=0.0042). Calculating the homology for this region, the identity is 39-40% with 68-70% similarity. The hydrophobic character of this protein indicates that like MdoH, the derived OpgH is a membrane localized protein. The transmembrane helices predicted by computer (SOSUI) are shown in Figure 4. The same program predicted 6 transmembrane helices for OpgH and 7 for MdoH.

We also identified two additional open reading frames in the region between the stop codon of *cerI* and the start codon of *opgH*. *orfX* (Fig.1) is 320 bp, and is positioned

between the two *mdo* homologues. Its' start codon overlaps the stop codon of *opgG*. The predicted gene product is 66 amino acids long. This third *orf* showed no significant homology to database sequences. The 273 bp *orfY* is downstream of *cerI*, separated from the *cer* genes by a strong stem-loop followed by a Shine-Dalgarno sequence. No homologue of known function was available in the databases for *orfY*, nor for the DNA sequence downstream of *orfY* to *opgG*.

A BLAST search of the available *Rhodobacter capsulatus* sequences (*R. capsulatus* homepage, <http://rhodol.uchicago.edu/capsulapedia>) is summarized in Figure 5. The predicted OpgG and *orf* 4027 of *R. capsulatus* are 60% identical with 71% similarity, while OpgH and *orf* 3014 of *R. capsulatus* are 63% identical with 75% similarity. The total lengths of the predicted *R. capsulatus* gene products correspond to those of the *opg* genes: 559 and 540 for the OpgG homologues, 609 and 591 for the OpgH homologues. The product of *orf* 4027 was predicted to be 46 amino acids longer on the N-terminal, than MdoG. The homology to the translated *R. sphaeroides* sequence starts with the 16th amino acid, suggesting, that OpgG may be longer, than MdoG. The predicted product of *orf* 3014, however, is 136 amino acid shorter at the N-terminal, than MdoH but only 8 amino acid longer, than the predicted OpgH.

The *opg* genes are functional in *R. sphaeroides* 2.4.1 .

In order to determine whether the *mdo* homologues are functional in *R. sphaeroides* 2.4.1 we constructed mutant strains bearing insertionally inactivated *opg* genes. The structure of the mutants is shown in Figure 6, and their OPG production is summarized in Table II. Inactivation of either one of the *opg* genes or *orfX* resulted in an OPG⁻ phenotype, confirming, that: a) these genes function in *R. sphaeroides* 2.4.1, b) they participate in

OPG production, and c) the pathway requires all three of the identified *orfs* to produce the OPGs. Replacement of *orfY* with a Km cassette, however, had no effect on OPG production.

***opgG* and *opgH* are not coupled transcriptionally.**

The Opg⁻ AP5 mutant bearing an inactive *opgG* gene produced wild type OPG when complemented with pNFR20 (Table II). The Ω cartridge inserted into *opgG* therefore had no polar effect on the downstream gene which contributes to OPG synthesis (*opgH*). EG18 carrying a Km cassette inserted into *opgH* in the same transcriptional orientation as the gene also produced substituted OPG when complemented with pGAK136, a clone containing an intact *opgH* gene. From these results we concluded, that -unlike *mdoG* and *mdoH* of *E.coli* - *opgG* and *opgH* belong to different transcriptional units.

***orfX* is transcriptionally coupled to *opgH*.**

Both EG13 and EG13R, containing *orfX* disrupted with a Km cassette in both forward and reverse orientation, respectively, were Opg⁻. We could not complement these mutants with pGAK135, a clone, containing only the wild type *orfX*. Knowing, that the Ω cartridge inserted into the *BamH* I site of *opgG* has no polar effect on downstream genes, we repeated the complementation experiment using clones containing additional DNA. pGAK245 and pGAK246 contain *orfX* and part of the *opgG* sequence starting from the *BamH* I site (Fig.6), in both the same and opposite orientation as the Tet promoter of the vector, respectively. In this case OPG production of the complemented mutants depended on the orientation of the cassette inserted into *orfX*: EG13 complemented with either pGAK245 or pGAK246 produced OPGs. EG13R, however, remained Opg⁻ in the presence of the same constructs, most likely due to a polar effect on

opgH, indicating transcriptional coupling between *opgH* and *orfX*. These results also suggest, that the promoter region of the proposed *orfX*, *opgH* transcription unit is positioned downstream of the *BamH* I site in *opgG*.

***orfY* is not essential for OPG production.**

Despite the possibility of transcriptional coupling between *orfY* and *opgG*, replacement of *orfY* by a Km cassette did not effect OPG production in the mutants. Thus, we conclude that the putative product of this *orf* is not essential to OPG production

The *opg* genes are not responsible for the increased exopolysaccharide production of the AI⁻ mutants.

To investigate the possible connection between the increased exopolysaccharide production of the AI⁻ mutants and the *opg* genes we constructed several double mutant strains. AP15 contains *cerI* and *opgG* disrupted with ΩKm and ΩSt/Sp cartridge, respectively, while EG IH contains *cerI* inactivated with ΩKm insertion in the gene, and *opgH* disrupted with a Tp cassette. Both double knockout mutants had AI⁻ colony morphology: increased exopolysaccharide production when compared to wild type. Since both of these mutants were Opg⁻, we concluded that neither *opgG* nor *opgH* contributes to the exopolysaccharide production of the AI⁻ mutants.

DISCUSSION

In an effort to learn more about the physiologic role of the quorum sensing system in *R. sphaeroides* 2.4.1 we investigated two open reading frames downstream of *cerI*, apparently transcribed in the same direction as the *cer* genes. Although previous data indicated the presence of an *ndvB* homologue on the small chromosome of *R. sphaeroides*, based upon their homology to the *mdoG* and *mdoH* genes of *E. coli* we considered, that if functional, these *orfs* were likely to be involved in osmoregulated periplasmic glucan synthesis of *R. sphaeroides*. Thus, the possibility also existed that these genes, if functional, could be the source of the exopolysaccharide in the CerI mutant. MdoG and the polypeptide derived from the *opgG* sequence are both predicted to be soluble proteins, and have no obvious domains indicative for their function. The product of *opgH*, however, is predicted to be a membrane protein, containing the catalytic domain of the glycosyl transferases. Although this protein is 256 amino acids shorter than MdoH, the similarity in structure (Fig.5) explains the successful complementation of an *mdoH* mutant of *E. coli* (Cogez et al., unpublished.).

To prove the functionality of the *orfs*' we constructed a series of mutants, in which these *orfs* were insertionally inactivated. Mutants were also isolated in order to learn about the role of the small *orfX* positioned between the *mdo* homologues. In all cases, the mutants were OPG⁻, confirming not only that the identified sequences are functional in *R. sphaeroides* 2.4.1, but that they are also essential for OPG biosynthesis under our experimental conditions.

While *orfX* proved to be transcriptionally coupled to *opgH* by complementation analysis, the relation between *orfY* and *opgG* remains to be determined. The inverted repeat downstream of *cerI* followed by a good Shine-Dalgarno sequence suggests, that *orfY* may not belong to the *cer* gene cluster, although this is not ruled out. Thus, the possibility existed that similarly to *orfX* and *opgH*, *orfY* might be cotranscribed with *opgG* (Fig.2). Replacement of *orfY* with a Km cassette, however, had no effect on OPG production of the mutants. Thus, it seems unlikely that *orfY* contributes to OPG production.

To date we have found a functional *mdoA* homologue on CI of *R. sphaeroides*, we have no data on the existence of an *mdoB* homologue. Similarly, we have found an *ndvB* homologue on CII, but as yet, no *ndvA* homologue. Moreover, the organization of the *opgA* locus in *R. sphaeroides* is different from that found in *E.coli*. Extending our search for OPG synthesis genes similar to those in *R. sphaeroides*, we tested the available *R. capsulatus* sequences. We have found genes homologous to *mdoGH*, and which are similar to the corresponding *R. sphaeroides* genes. The homology detected in the *Rhodobacter* strains, however, starts upstream of the start codon of the *E. coli mdoG* gene (Fig.5). We predicted the start of *opgG* based upon a putative Shine-Dalgarno sequence present between bp 3024-3030, and the lack of such a sequence between bp 2930-2936 (Fig.2). Like in *R. sphaeroides*, we could not detect significant homology to *mdoB* in *R. capsulatus*. In this bacterium, however, we could not find any significant homology to *ndvB*, either. Therefore *R. sphaeroides* remains the only bacterium in which the presence of members belonging to different OPG synthesis gene families is demonstrated. As might be anticipated, the OPGs produced by *R. sphaeroides* are also different from those

produced by *E. coli* as well as from those found in members of *Rhizobiaceae*. Instead of the linear β -1,2-glucose backbone expected from the presence of a functional *mdoH* homologue, OPGs of *R. sphaeroides* are cyclic (Talaga et al., 2000), which would suggest the participation of an *ndvB* homologue in their synthesis. On the other hand, every cyclic subunit contains an α -1,6 linkage (Talaga et al., 2000), which is not characteristic for the subunits known to be synthesized by NdvB catalysis. Further, the Opg⁻ phenotype of the *opgH* knockout mutant confirms the contribution of this gene product to OPG synthesis. Based upon the structure of the *R. sphaeroides* OPGs Talaga raised the possibility, that a third gene family may be responsible for their synthesis (Talaga et al., 2000). However, knockout mutations in *opgG*, *opgH* and *orfX* resulted in an Opg⁻ phenotype, suggesting, that *R. sphaeroides* does not have a third gene family of OPG synthesis genes. Further, despite the fact, that OPGs from *R. sphaeroides* are highly substituted by succinyl residues, no gene homologous to *mdoC* of *E. coli* was found to date. However, Tn5 mutagenesis revealed that in *R. sphaeroides* the product of *orfZ* is responsible for the same function (Cogez et al., unpublished). Considering the model of the OPG biosynthetic complex proposed for *E. coli* (Bohin, FEMS 2000), a third type of OPGs yet to be found in *R. sphaeroides* may rather be synthesized by a complex organized on the basis of OpgG and OpgH with other “subunits”, different from those in *E.coli*.

In this free-living, photosynthetic bacterium we are investigating two systems, generally associated with biological processes related to cooperative lifestyles, in some cases even interacting during these processes. Preliminary qualitative analysis of the exopolysaccharides produced by an AI⁻ mutant of *R. sphaeroides* 2.4.1 (Puskas et al.,

1997.) indicated that they might originate from the OPG biosynthesis pathway. The high level of exopolysaccharide production in the *CerI*⁻ *OpgG*⁻ and *CerI*⁻ *OpgH*⁻ double knockout mutants, however, is rather suggestive of a different origin. As we could not detect any connection between the *cer* and the *opg* genes, in preliminary experiments it also appears that a *CerI*, *NdvB*⁻ double knockout mutant continues to produce exopolysaccharides.

ACKNOWLEDGEMENTS

A portion of this work was supported by grant GM-55481 to S.K.

REFERENCES

1. Allen, L. N., and Hanson, R. S. 1985. Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *J. Bacteriol.* **161**:955-962.
2. Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. 1995. Capsular Polysaccharide Biosynthesis and Pathogenicity in *Erwinia stewartii* Require Induction by an N-Acylhomoserine Lactone Autoinducer. *Journal of Bacteriology* **177**:5000-5008.
3. Bhagwat, A. A., and Keister, D.L. 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.
4. Bohin, J.-P. 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **186**:11-19
5. Bohin, J.-P., and Kennedy, E. P. 1984. Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**:956-957.
6. Breedveld, M. W., Hadley, J.A., and Miller, K.J. 1995. A Novel Cyclic β -1,2-Glucan Mutant of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **177**:6346-6351.
7. Cangelosi, G. A., Martinetti, G. and Nester, E.W. 1990. Osmosensitivity Phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* Mutants That Lack Periplasmic β -1,2-Glucan. *Journal of Bacteriology* **172**:2172-2174.

8. Choudhary, M., Mackenzie, R. C., Nereng, K., Sodergren, E., Weinstock, G. M. and Kaplan, S. 1997. Low-resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: chromosome II is a true chromosome. *Microbiology* **143**:3085-3099.
9. Coge, V., Puskas, A., Gak, E., Kaplan, S., and Bohin, J-P. 2000. The *opgC* gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. Unpublished.
10. Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom, and R. Y. Stainer. 1956. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**:25-68
11. Darveau, R. P., and Hancock, R. E. W. 1983. Procedure for Isolation of Bacterial Lipopolysaccharides from Both Smooth and Rough *Pseudomonas Aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of Bacteriology* **155**:831-838.
12. Debarbieux, L., Bohin, A., and Bohin, J.-P. 1997. Topological Analysis of the Membrane-Bound Glukosyltransferase, MdoH, Required for Osmoregulated Periplasmic Glucan Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**:6692-6698.
13. Dolph, P. J., Majerczak, D. R. and Coplin, D. L. 1988. Characterization of a Gene Cluster for Exopolysaccharide Biosynthesis and Virulence in *Erwinia stewartii*. *Journal of Bacteriology* **170**:865-871.
14. Dylen, T., Nagpal, P., Helinsky, D. R., and Ditta, G. S. 1990. Symbiotic Pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* Mutants. *Journal of Bacteriology* **172**:1409-1417.
15. Dylen, T., Helinsky, D. R., and Ditta, G. S. 1990. Hypoosmotic Adaptation in *Rhizobium meliloti* Requires β -(1-2)-Glucan. *Journal of Bacteriology* **172**:1400-1408.

16. Ebel, W., Vaughn, G. J., Peters III, H. K., and Trempy, J. E. 1997. Inactivation of *mdoH* Leads to Increased Expression of Colanic Acid Capsular Polysaccharide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179:6858-6861.
17. Eraso, J. M., and Kaplan, S. 1994. *prpA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* 176:32-34.
18. Fornari, C. S., Watkins, M., and Kaplan, S. 1984. Plasmid distribution and analyses in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Plasmid* 11:39-47.
19. Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J., and Ugalde, R. A. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1-2) glucans. *J.Bacteriol.* 169:880-884.
20. Gosti, F., Huang, Y., and Sequeira, L. 1991. Molecular analysis of a gene that affects extracellular polysaccharide production and virulence in *Pseudomonas solanacearum*. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Kluwer Academic Publishers, H. Hennecke and D.P.S. Verma (eds.) 1:73-77.
21. Iepi, L., Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R., and Stanfield, S. W. 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.
22. Inon de Iannino, N., and Ugalde, R. A. 1989. Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -(1-2)-glucan. *J. Bacteriol.* 171:2842-2849.

23. Jackson, B. J., and Kennedy, E. P. 1983. The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membrane-bound phosphoglycerol transferase. *J. Biol. Chem.* **258**:2394-2398.
24. Jackson, B. J., Bohin, J.-P., and Kennedy, E. P. 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* **160**:976-981.
25. Keen, N. T., Tamaki, D. and Trollinger, D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191-197.
26. Kennedy, E. P. 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1092-1095.
27. Kennedy, E. P. 1987. Membrane-Derived Oligosaccharides (Periplasmic Beta-D-Glucans) of *Escherichia coli*. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology **1**:672-679.
28. Lacroix, J.-M., Lanfroy, E., Cogez, V., Lequette, Y., Bohin, A., and Bohin, J.-P. 1999. The *mdoC* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Membrane Protein That Is Required for Succinylation of Osmoregulated Periplasmic Glucans. *Journal of Bacteriology* **181**:3626-3631.
29. Leigh, J. A., Battisti, L., Lee, C. C., Ozaga, D. A., and Astete, S. 1993. Role in Nodulation and Genetic Regulation of Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti*. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Kluwer Academic Publishers, E.W. Nester and D.P.S. Verma (eds.) 175-181.

30. Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J.-M., and Bohin, J.-P. 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*. *Molecular Microbiology* 10:329-340.
31. Mackenzie, R. C., Simmons, A. E., and Kaplan, S. 1999. Multiple Chromosomes in Bacteria: The Yin and Yang of *trp* Gene Localization in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Genetics* 153:525-538.
32. Mukhopadhyay, P., Williams, J., and Mills, D. 1988. Molecular Analysis of a Pathogenicity Locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J.Bacteriol.* 170:5479-5488.
33. Oh, J.-I., Eraso, J.M., and Kaplan, S. 2000. Interacting Regulatory Circuits Involved in Orderly Control of Photosynthesis Gene Expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *J.Bacteriol.* 182:3081-3087
34. Prentki, P., and Kirsch, H. M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29:303-313.
35. Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S. and Schaefer, A. L. 1997. A Quorum-Sensing System in the Free-Living Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* 179:7530-7537.
36. Puvanesarajah, V., Shell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J. and Nester, E.W. 1985. Role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 164:102-106.
37. Reuber, T. L., Reed, J. W., Glazebrook, J., Urzainqui, A., and Walker, G. C. 1991. Analyses of the roles of *R. meliloti* exopolysaccharides in nodulation. *Advances in*

Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Kluwer Academic Publishers, H. Hennecke and D. P. S. Verma (eds.) 1:182-188.

38. **Rosenberg, M., and Rosenberg, E.** 1981. Role of Adherence in Growth of *Acitenobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Journal of Bacteriology* **148**:51-57.
39. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
40. **Schell, M. A., Denny, T. P., Clough, S. J., and Huang, J.** 1993. Further characterization of genes encoding extracellular polysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* and their regulation. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Kluwer Academic Publishers, E. W. Nester and D. P. S. Verma (eds.) 231-239.
41. **Simon, R., Prierer, U., and Puhler, A.** 1983. A broad-host-range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:37-45.
42. **Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* **8**:3-26.
43. **Talaga, P., Coge, V., Wieruszeski, J.-M., Stahl, B., Lemoine, J., Lippens, G. and Bohin, J.-P.** Unpublished. Osmoregulated periplasmic glucans of *Rhodobacter sphaeroides*.
44. **Torres-Cabassa, A., Gottesman, S., Frederick, R. D., Dolph, P. J. and Coplin, D. L.** 1987. Control of Extracellular Polysaccharide Synthesis in *Erwinia stewartii* and

Escherichia coli K-12: a Common Regulatory Function. *Journal of Bacteriology* 169:4525-4531.

45. van Neil, C. B. 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol. Rev.* 8:1-118.

46. Weckesser, J., Zalman, L. S., and Nikaido, H. 1984. Porin from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 159:199-205.

47. Wang, P., Ingram-Smith, C., Hadley, J. A. and Miller, K. J. 1999. Cloning, Sequencing, and Characterization of the *cgmB* Gene of *Sinorhizobium meliloti* Involved in Cyclic β -Glucan Biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 181:4576-4583.

48. Zhang, Y., and Miller, R. M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2101-2106.

49. Zorreguieta, A., and Ugalde, R. A. 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* ssp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1-2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 167:947-951.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Genetic map of the 7921 bp *HindIII*, *BamHI* segment of cosmid 1G10. *cerR*, *orf2* and *cerI* were previously described (Puskas et al. 1997), *orfZ* is discussed separately (Cogez et al., unpublished).

Figure 2. Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of *opgY*, *opgG*, *orfX* and *opgH*. Putative Shine-Dalgarno sequences are underlined, bold type indicates putative start codons, and arrows the inverted repeats. This nucleotide sequence can be found in GeneBank (AF016298)

Figure 3. Alignment of *opgG* and *opgH* with *mdoG* (sp|P33136|MDOG ECOLI) and *mdoH* (sp|P33137|MDOH ECOLI), respectively. The alignments were generated using SeqVu version 1.1 program. Similar amino acids are shaded, the identical ones are shaded and boxed.

Figure 4. Comparison of computer predicted structural elements in OpgH (derived amino acid sequence) and MdoH. Dark shading indicates the predicted transmembrane helices (SOSUI), and pale shading covers the domain characteristic of the glycosyl transferases (Pfam). Note, that a structural model of MdoH proposed by Debarbieux et al. (1997) based upon experimental data contains 8 transmembrane helices.

Figure 5. Schematic structure of the mutants and the complementing fragments used in this study.

Figure 6. Alignment (SeqVu version 1.1) of the MdoG and MdoH homologue sequences of *R. sphaeroides* and *R. capsulatus* with MdoG and MdoH of *E.coli*. The *R. capsulatus* *orfs* were identified by a BLAST search on the sequences available in Capsulapedia*,

using the 7921 bp long *Hind* III, *Bam* HI fragment (Figure 1.) as query sequence. Similar amino acids are shaded, the identical ones are shaded and boxed.

* (<http://rhodol.uchicago.edu/capsulapedia>)

Table I. Bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Characteristics	Reference
Bacterial strains		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	Wild type, two circular chromosomes and 5 additional endogenous replicons	(45)
AP3	<i>cerI</i> :: Ω Km	(35)
AP5	<i>opgG</i> :: Ω StSp	This study
EG18	<i>opgH</i> ::Km, same orientation	This study
EG13	<i>opgX</i> ::Km, same orientation	This study
EG13R	<i>opgX</i> ::Km, reverse orientation	This study
EGY15	Δ <i>orfY</i> ::Km, same orientation	This study
EGY3R	Δ <i>orfY</i> ::Km, reverse orientation	This study
AP15	<i>cerI</i> :: Ω Km <i>opgG</i> :: Ω StSp	This study
EGIH	<i>cerI</i> :: Ω Km <i>opgH</i> ::Tp	This study

pUC4K	Source of Km cartridge	Pharmacia
Litmus 28	Amp ^r	New England BioLabs
pUI1680	Source of Tp cartridge	(33)

Constructs

1G10	pLAFRX-derived cosmid clone from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 ^T library	(31)
pGAK110	5.6 kb <i>EcoR</i> I fragment of 1G10	This study
pGAK112	The 1.3 kb <i>Eco47</i> III fragment was deleted from pUI2509	This study
pGAK114	The 2.1 kb <i>Sal</i> I fragment of pGAK112 in pUC19 (<i>orfX</i> , part of <i>opgH</i>)	This study
pGAK115	1.3 kb <i>EcoR</i> V- <i>Bgl</i> II fragment of pGAK110 (<i>opgH</i>) in Litmus 28	This study
pGAK116D	pGAK114 with a Km cartridge in the <i>Xho</i> I site in the same orientation of <i>orfX</i>	This study
pGAK116R	pGAK114 with a Km cartridge in the <i>Xho</i> I site in reverse orientation to <i>orfX</i>	This study
pGAK117D	pGAK115 with a Km cartridge in the <i>Sal</i> I site in the same orientation of <i>opgH</i>	This study
pGAK118	pSUP202Δ derivative; the 440 bp <i>Sca</i> I- <i>Aat</i> II fragment was replaced with the 3.3 kb <i>Aat</i> II - <i>Eco47</i> III fragment of pGAK116D	This study

pGAK119	pSUP202Δ derivative; the 440 bp <i>Sca</i> I- <i>Aat</i> II fragment was replaced with the 3.3 kb <i>Aat</i> II - <i>Eco</i> 47 III fragment of pGAK116R	This study
pGAK120	pSUP202Δ derivative; the 1.2 kb <i>Sca</i> I fragment was replaced with the 3.4 kb <i>Sna</i> B I – <i>Eco</i> R V fragment of pGAK 117D	This study
pGAK125	1.2kb <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I fragment of pUI2509 in Litmus 28/ <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I	This study
pGAK135	1.2kb <i>Bgl</i> II- <i>Kpn</i> I fragment of pUI2509 in pRK415/ <i>Bam</i> H I- <i>Kpn</i> I (<i>orfX</i>)	This study
pGAK136	2.2kb <i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II fragment of pGAK115 in pRK415/ <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> H I (<i>opgH</i>)	This study
pGAK229D	pGAK125Δ <i>Sac</i> II::Km, the cartridge is in the same orientation of <i>orfY</i>	This study
pGAK229R	pGAK125Δ <i>Sac</i> II::Km, the cartridge is in reverse orientation to <i>orfY</i>	This study
pGAK230	2.1kb <i>Eco</i> R I- <i>Nco</i> I fragment of pGAK229D in pSUP202/ <i>Eco</i> R I- <i>Nco</i> I	This study
pGAK231	2.1kb <i>Eco</i> R I- <i>Nco</i> I fragment of pGAK229R in pSUP202/ <i>Eco</i> R I- <i>Nco</i> I	This study
pGAK138	pGAK120 with a Tp cartridge in the <i>Sma</i> I site	This study
pGAK245	1.8kb <i>Bam</i> H I fragment of pUI2509 in pRK415/ <i>Bam</i> H I; <i>orfX</i> in the same orientation of the tet promoter	This study
pGAK246	1.8kb <i>Bam</i> H I fragment of pUI2509 in pRK415/ <i>Bam</i> H I; <i>orfX</i> in reverse orientation	

	to the tet promoter	This study
pGAK247	3.5kb <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I fragment of pUI2509 in pRK415/ <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I	This study
pNFR14	5.0 kb <i>Apa</i> I – <i>Bal</i> I fragment of pUI 8166 in pUC19/ <i>Sma</i> I	This study
pNFR15	2.0 kb <i>Hind</i> III - <i>EcoR</i> V fragment of pNFR14 in pUC19/ <i>Hind</i> III, <i>Sma</i> I	This study
pNFR20	2.0 kb <i>Hind</i> III - <i>Kpn</i> I fragment of pNFR15 in pRK415/ <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I	This study
pUI8166	pLA2917-derived cosmid clone from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 ^T library	(1)
pUI2506	3.4 kb <i>Not</i> I – <i>Xho</i> I fragment (Ω Km disrupted <i>cerI</i>) in pSUP202 Δ <i>Sca</i> I	(35)
pUI2509	3.5 kb <i>Sal</i> I fragment of pUI8166 (<i>opgG</i>) in pBS II SK(+)	This study
pUI2511	2.2 kb <i>EcoR</i> I fragment of pUI2509 in pBS II SK(+); the <i>BamH</i> I site of the vector was previously inactivated	This study
pUI2512	pUI2511 with an Ω StSp cartridge in the <i>BamH</i> I site of the insert	This study
pUI2513	pSUP202 derivative; the 1.2 kb <i>Sca</i> I fragment was replaced with the 4.2 kb <i>EcoR</i> I fragment of pUI2511	This study

Table II. OPG production of the mutants

<i>Mutant</i>	<i>gene disrupted</i>	<i>insertion</i>	<i>Complemented with</i>	<i>OPG</i>
AP5	<i>opgG</i>	Ω St/Sp	-	-
AP5	<i>opgG</i>	Ω St/Sp	pNFR21	+
EG18	<i>opgH</i>	Km Forward	-	-
EG18	<i>opgH</i>	Km Forward	pGAK136	+
EG13	<i>opgX</i>	Km Forward	-	-
EG13	<i>opgX</i>	Km Forward	pGAK135 pGAK245 pGAK246	- + +
EG13R	<i>opgX</i>	Km Reverse	-	-
EG13R	<i>opgX</i>	Km Reverse	pGAK135 pGAK245 pGAK246	- - -
EGY15	<i>orfY</i>	Km Forward	-	+
EG3R	<i>orfY</i>	Km Reverse	-	+
AP15	<i>opgG,cerI</i>	Ω St/ Sp, Ω Km	-	-
AP15	<i>opgG,cerI</i>	Ω St/Sp, Ω Km	pUI8166	+
EG IH	<i>opgH,cerI</i>	Tp Rev/ Ω Km	-	-
EG IH	<i>opgH,cerI</i>	Tp Rev/ Ω Km	pUI8166	+

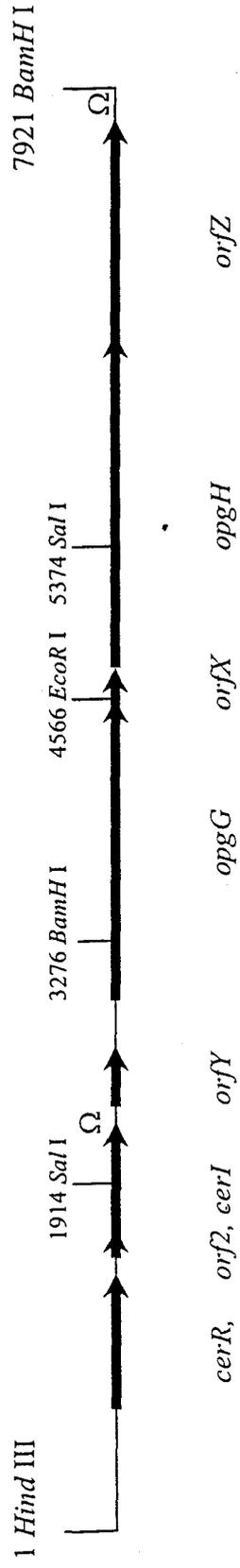


Fig. 1

CGCCTGAACGGGGCAGACATCCGCCGCAACCCGGATCTTCCCGTTGCGGACCAGGTCTGACGCAGGCACTTCGGACTGGCGGCCGA 2314
 *
 CATGGCCGCCCGCCGCCACGGAGGATCAGCATGGCGCAGCCTGAGCCAGACCCGGCAGAAGGTGACCGAACTCGCCGCCCGGGCGCCCCCGGGGACGA 2414
 M A Q P E P D R Q K V T E L A A R R P P R D D 23

CCGGGGCGAGCACGGCTGGCTTGTGCCTCACCTGATCTCGCTCGTGGGCTATGCCGAGCGCCACGGGCTGACCGAGATCGAGGCAGCGCTCGCCGAGGCG 2514
 R G E H G W L V P H L I S L V G Y A E R H G L T E I E A A L A E A 56

GCCGAACGGATCGCGCCTGCGGTGCAATCCGAGGCTGCGGAGACGACCCCGCCAGCGAGCGGCTGTTCTATCTCCGCCGCCCTACCCCGAGAAGCGCG 2614
 A E R I A P A V Q S E A A E T T P A E S R L F Y L R R P Y P E K R D 90

ACTGAGCCCGATGGGCCCGGCCTGACCCTTCTGCGGTGCGGGCAGCCGCGACTCAGAGGCCTGACC GCGGTTCTTCTCTGCTGTCTGCACCCGAG 2714
 *

CATCAGCCACCGGGCGCGCTTTTGAGGCGGCGTCCGAACCTCCGGGGCGTCTGGCGCGAGAAGGTGCGCTCATTTGCACACATCTTCGGCGAATCCGCG 2814

CTCACGCCCTGATGCGACGCTGCTGCGCTTGCAAGTGCCTGCGGCACAACCATATGCTGGACGATGCGAATCTTGGAAATTGCGCTCTGCAAGCCATT 2914

GAAAAACGGACGTCGTCTCTCTGATATGCCCGCTCCTGCCGCCCCCTCCGCCCGCTGAACCGGGCGCTGCTGCTCAGCGCGGCAAGTTCGTGCTCGCTCGCC 3014

CTCGCTGCAAGCGGGCTCATGGGGCTGCCCTCCGGGCTCAGGAGGCGCTGCCGACGCGCTCCGGCTCTGTTCCGGTTCGCTGCGCCGACGAGTTCA 3114
 M G L P L R A Q E A P A D A P P A S V P V A A P Q Q F S 28

GCTATGACTGGCTGACGGAAGAGATGCGGGTTCGCGGCCACGCAGCCGATGTCGAGCCCGAGAACCTGACGGGGTTCCTGGGCGAGCTGCAGTACGACGA 3214
 Y D W L T E E M R V A A T Q P H V E P E N L T G F L G E L Q Y D D 61

TTACCGCTCGATCAACTTCCGCACCGACCGCTCCCGCTGGGCGGATACGGACAGCATGTTCCGGATCCAGGCCTTCCACCTCGGCTGGCTGTTCCGGCGCT 3314
 Y R S I N F R T D R S R W A D T D S M F R I Q A F H L G W L F G A 94

CCGGTCCGCCTCTATGACGTGACCGACGGCTATGTGCACGAGGTTGCTTCTCGACCGACGATTTGCAATACCGCAACGAACTGTCCACCCGCGTGGCGG 3414
 P V R L Y D V T D G Y V H E V R F S T D D F E Y R N E L S T R V A A 128

CCCATGTGGACCTGCCCGGCGTGGCGGGCTTCCGGCTGAACTTCCCGCTGAACCGGCCGGACGCTTTCGACGAGCTCGTGGCCTTTCTCGGCGCGAGCTA 3514
 H V D L P G V A G F R L N F P L N R P D V F D E L V A F L G A S Y 161

CTTCCGCGCGCTCGGCCGCGGCAACGGCTACGGCATCTCGGCCCGGGGCTGGCCGTCAACACGGCCACCTCCGCGCCGAGGAATTTCCCGCTTCTCG 3614
 F R A L G R G N G Y G I S A R G L A V N T A T S A P E E F P R F S 194

CGCTTCTATCTCGAGCGCCCGCACGGCGGGCGCCTGTGCGCCGCTCTCTATGCCGCGATGGAGAGCCCGAGCGTACCCGGCGCCTACCGCTTCGTATCA 3714
 R F Y L E R P H G G G L S A V L Y A A M E S P S V T G A Y R F V I T 228

CGCCCGCATCGAGACGATGATCGAGGTGACGGCGCGTCTCTTCTTCCGCGAGCGCTGTGACCCAGCTCGGCGTGGCACCCTGACCTCGATGTTCTCTT 3814
 P G I E T M I E V T A R L F F R S A V T Q L G V A P L T S M F L F 261

CAGCGAGAAGAACCGCGCCACCTACGACGATTTCCGCCCAATGTGCACGACAGCGACGGCCTGGCCGTCCGGCGCCGCGACGGCGACATCCTCTGGCGG 3914
 S E K N R A T Y D D F R P N V H D S D G L A V R R R D G D I L W R 294

↓
orfY

opgG

CCGCTGAACAACCCCGCGGGCTCGCCAGCAGCTACTTCGGCGAGGAGAACCCCGAGGCCCTTCGGCCTGCATCAGCGCAAGCGGTCTTCGACGACTATC 4014
 P L N N P P R L A S S Y F G E E N P Q A F G L H Q R K R S F D D Y Q 328

 AGGACGCCGAAGCCCATACGAGCTGCGGCCCTCGGTTCGATGTCGAGCCCATCGGCGACTGGGGCAAGGGGATGGTTCGGCTCGTTCGAGATCCCGACCCG 4114
 D A E A H Y E L R P S V D V E P I G D W G K G M V R L V E I P T R 361

 CTACGAGACGAACGACAACATCGTGGCCTTCTGGGTGCCGGAAGGGCAGATCTCCGCCGGCGATGCGCGGAATTCGCCTACCGCCTTCGGTGGGGGGCT 4214
 Y E T N D N I V A F W V P E G Q I S A G D A R E F A Y R L R W G A 394

 CTGCCCATCGAAGAGCCGTCCGACATCGCCACATCTGGGAGACGCGGGCCGGTACGCGCGCGTTCGCGGGGTGGAGAATACGGGCGAGACCCGCAAGT 4314
 L P I E E P S D I A H I W E T R A G H G G V S G V E N T G E T R K F 428

 TCGTCATTGATTTCAAGGGGGTCTGTTGGGCGGACTTCCCGGGGACCGGAGGTGGAAGCCATCACCTCCGTGCAGCACGGACAAATCGTTCACGCAGAC 4414
 V I D F K G G L L G G L P G D A E V E A I T S V Q H G Q I V T Q T 461

 TCTTGAACGGCTGGACGGGATGGACATATGGCGTCTCGTTCTCGACGTGGCCGCGAGCCGAGGGGGCCACGGTGGAACTGGCGGCGCACATCGCCGGTTAT 4514
 L E R L N G M N I W R L V L D V A A A E G A T V E L A A H I A G Y 494

 GGACGGAACTCTCGGAAACATGGCTCTATCAGTGGATGAAAGCCTGATGTCGAATTCGCGGACTCCTTGCAGACCCGGCGCCCTCGAGGCGAGCTCGGT 4614
 G R K L S Q T W L Y Q W M K A * 509
 M S N S A D S L Q T G A L E A S S V 18

 CGAAGATATCGCGGTCTGGTGGACCGGATCGGCGCACCTCCGGCCGCGCCCTGCGCCATGCCAAGCAGCAGCTTGAACCGGCCGCGACCGGCCTGTTC 4714
 E D I A V L V D R I G A P P A A P C A M P K Q Q L E P A A T G L F 51

 TCGATGCTCGCGCTGTTCCGGGTGGGTGCCCCGAGGCGGAGCAGCTGAGCCATGCCCGCGGAGCGGCGCCGTTCGCGCCGTTCACGCTGGCCTCGCGTCTCG 4814
 S M L R L F G V G A P R P E H * 66
 M P A E R R R R A V T L A S R L V 17

 TTGCGGCGCGATCAGCCTCACCGCGGCGAGCCGGGGCCTTCTTTCTTTTCTGCAGTTCGGCTCGACCGACGGGCTCGATTTCGATGGACATCACGCGGAG 4914
 A A A I S L T A A A G A F F L F L Q F G S T D G L D S M D I T R S 50

 CGTGCTGATCCTCGTCTCGACCTCGTGGCTCGGGTGGGGTGCCGCCCATGCGGTGCTCGGCCTTCTTCGCGCCCGCAGCGGCCCGGAACGTGTGCCCC 5014
 V L I L V S T S W L G W G A A H A V L G L F S R P Q R P A N V S P 83

 GACGCGCCGATCTCAACGCGCACGGTTATTCTCGTCCCGTCTATAACGAGGATCCTGTAGCGACCTTCTCGCGCATCGCGGCGATGGACGCGTCTCTCG 5114
 D A P I S T R T V I L V P V Y N E D P V A T F S R I A A M D A S L A 117

 CCGCCACGCCCTGGCGGACCTGTTCCATTTTCGCGATCCTCTCTGACACTCGGGACGAGGCCATCGCCGCGCGGAGCGGTTCTGGTTCCTGCGCCTTCT 5214
 A T P W R D L F H F A I L S D T R D E A I A A R E R F W F L R L L 150

 CCGCGAGCGGATGCCGAGGGTTCGCATCTTCTACCGCCGCGCGCGGTGAACCGCGGCCGAAAGGGCGGCAATATCGAGGATTCATCCAGAAGTCCGGC 5314
 R E R D A E G R I F Y R R R A V N R G R K A G N I E D F I Q K S G 183

 TCCGCTATCCGTTCCGCGTGCATCCTCGATGCCGACAGCCTGATGGAAGCGGAAACGCTGGTTCGACATGGTTCGCGCGGATGGAGGCCGAGCCGCGTCTCG 5414
 S A Y P F A V I L D A D S L M E G E T L V D M V R R M E A E P R L G 217



orfX

GGCTGCTCCAGACGCTGCCGGTGGTGACGAAGTTCGGGGCGGTTCGATGCAGTTCTCGGCCGCTCCATGCGCCGGTCTTCGCGCGCGGGCTGGCGATGAT L L Q T L P V V T K F G R S M Q F S A A L H A P V F A R G L A M M	5514 250
GCAGGGCCGCACCGGCCGTTCTGGGGCCACAATGCCATCGTGCGAGTACAGGCTTTCGCGGAAAGCTGCGGCCTGCCCGAGCTGTCCGGTCCGCCCCC Q G R T G P F W G H N A I V R V Q A F A E S C G L P E L S G P P P	5614 283
TTCGGCGCCATGTTCATGAGCCACGATTATGTTCGAGGCGGGCTCCTTGCACGCGCAGGCTGGATCGTCCGGTTCGATGACGACATCCGCGGCTCCTACG F G G H V M S H D Y V E A A L L A R A G W I V R F D D D I R G S Y E	5714 317
AAGAAGGCCCCGAAAATCTGGTGGACCATGCGAAGCGCGACCGGGCGCTGGTGTTCAGGGCAACCTCCAGCACGGGCGCATCCTGTTCGCTCCCGGCCCTCTG E G P E N L V D H A K R D R R W C Q G N L Q H G R I L F A P G L C	5814 350
CGGCTGGAACCGCTTCGTGTTCTTCGAGGGCATCATGGCCTATATCGCGCCGCTCTTCTGGCTGGGCTTCATCATGGCCTCGATCGCGGCGCCCTTCTTC G W N R F V F L Q G I M A Y I A P L F W L G F I M A S I A A P F F	5914 383
GCCCCGCCGCTCGATTATTTCCCGGTGCCCTACTGGCCCTTCCCGGTCTTCCCCTCGGACGAGACCTGGAAAAGCCATCGGCCTCGCCGTGGGCATCTTCG A P P L D Y F P V P Y W P F P V F P S D E T W K A I G L A V G I F G	6014 417
GCCTTCTGCTGCTGCCAAGCTCATGATCGCCATCGAGGCCATCGTGACCGGCCGCGGGGGCTTCGGCGGTGCCGGGCGCTCCTCGTCTCGACGCT L L L L P K L M I A I E A I V T G R A A G F G G A G R V L V S T L	6114 450
GGCCGAGCTTGTCTTCTCCAGCATCATCGCGCCGATCCTCATGGCCTTTCAGACCCGTTTCGGTGTGCAGGTGCTGCTCGGCCGCGATGGCGGCTGGCCC A E L V F S S I I A P I L M A F Q T R S V L Q V L L G R D G G W P	6214 483
ACCAACAATCGCGGCGACGGCAGCCTCTCCGTGGCGCAGGCTGGTTCGGCCAGCCATTGGATCGTGACCTGGGGCCTTATCGGCATCGGCGCCACCTATT T N N R G D G S L S V A Q A W S A S H W I V T W G L I G I G A T Y Y	6314 517
ACTTCGCTCCGGCCTCGTGCCCTGGCTGCTTCCGGTGGCCCTTCCCATGATCTTCTCGCCGCTCGTGATCGCGGTCACCTCGAAGCGCAGCCGCTCGGC F A P G L V P W L L P V A L P M I F S P L V I A V T S K R S R S A	6414 550
GCTCTTACCATGCCGCTCGAAGTCCGCGGACGCCGGTGTCTTCTGGCGCATGACGCAATCCTCGCCGACTGGGAGCGCAGCCCCGCGCCCGAGGCTGTT L F T M P L E V A P T P V L L A H D A I L A D W E R S P A P E A V	6514 583
CCGGCGCTGGCGGTGAGCCATGCCTGACCATCCCCCAGGGTCCGGGACCGGACAAGCGGCTCGACTTCTTCCGCGGTCTGGCTC P A L A V S H A *	6600 591

orfH

orfZ



1	MGLPLRAQEAPADA	PPASVPVAAPQQ	FSYDWL	TEEMRVA	ATQPH	44																																							
1	M-MKMRWLS-A--	AVMLTLYTSSSWA	FSID	DVAKQAQSL	AGKGY	40																																							
45	VEPE-NLTGFLGELQY	DDYRSINFR	TDRSRW	ADTDSM	FRLQAFH	87																																							
41	ETPKSNLPSVFRDMKY	ADYQQIQ	FNHDKAY	WNNLKT	PKLEFYH	84																																							
88	LGLWLF	GAPVRLYD	VT	DGYV	HEVRFS	STDD	F	EYRNEL	STRVA	AHV	D	131																																	
85	QGM	YFDTP	VKIN	EV	TATA	V	KRIK	YS	PDY	F	TFGDVQHD	KDTVK-D	127																																
132	LPGV	AGFR	LN	FP	LN	RP	D	V	F	DEL	V	A	FLG	ASY	F	R	AL	G	R	G	NG	Y	G	I	S	A	175																		
128	L-G	F	A	G	F	K	V	L	P	I	N	S	K	D	K	N	D	E	I	V	S	M	L	G	A	S	Y	F	R	V	I	G	A	G	Q	V	Y	G	I	S	A	170			
176	RGLAVN	TATSAP	EEFPR	FSR	FYL	ERPH	GGGL	SAV	LYA	A	M	E	S	P	S	V	219																												
171	RGLA	IDTAL	PSG	EEFPR	FKE	FWI	ERPK	PTDK	R	L	T	I	Y	A	L	L	D	S	P	R	A	214																							
220	TGAYR	FVIT	PGI	ETM	IEV	TAR	L	FFR	S	AV	TQ	L	G	V	A	P	L	T	S	M	F	L	F	S	E	263																			
215	TGAYK	FVVM	PGR	DT	V	V	D	V	Q	S	K	I	Y	L	R	D	K	V	G	K	L	G	V	A	P	L	T	S	M	F	L	F	G	P	258										
264	KNRATY	DDFR	PNV	H	D	S	D	G	L	A	V	R	R	R	D	G	D	I	L	W	R	P	L	N	N	P	P	R	L	A	S	S	Y	F	307										
259	NQPS	PANNY	R	P	E	L	H	D	S	N	G	L	S	I	H	A	G	N	G	E	W	I	W	R	P	L	N	N	P	K	H	L	A	V	S	S	F	302							
308	G	E	E	N	P	O	A	F	G	L	H	O	R	K	R	S	F	D	D	Y	Q	D	A	E	A	H	Y	E	L	R	P	S	V	D	V	E	P	I	G	D	W	G	K	G	351
303	S	M	E	N	P	O	G	F	G	L	L	O	R	G	R	D	F	S	R	F	E	D	L	D	D	R	Y	D	L	R	P	S	A	W	V	T	P	K	G	E	W	G	K	G	346
352	M	V	R	L	V	E	I	P	T	R	Y	E	T	N	D	N	I	V	A	F	W	V	P	E	G	Q	I	S	A	G	D	A	R	E	F	A	Y	R	L	R	W	G	A	L	395
347	S	V	E	L	V	E	I	P	T	N	D	E	T	N	D	N	I	V	A	Y	W	T	P	D	Q	L	P	E	P	G	K	E	M	N	F	K	Y	T	I	T	E	S	R	D	390
396	P	I	E	-	E	P	S	D	I	A	H	I	W	E	T	R	A	G	H	G	G	V	S	G	-	-	-	V	E	N	T	G	E	T	R	K	F	V	I	D	F	K	G	G	435
391	E	D	K	L	H	A	P	D	N	A	W	V	Q	T	R	R	S	T	G	D	V	K	Q	S	N	L	I	R	Q	P	D	G	T	I	A	F	V	V	D	E	T	G	A	434	
436	L	L	G	G	L	P	G	D	A	E	V	E	A	I	T	S	V	-	Q	H	G	Q	I	V	T	Q	T	L	E	R	L	D	G	M	D	I	W	R	L	V	L	D	-	V	477
435	E	M	K	K	L	P	E	D	I	P	V	T	A	Q	T	S	I	G	D	N	G	E	I	V	E	S	T	V	R	Y	N	P	V	T	K	G	W	R	L	V	M	R	V	K	478
478	A	A	A	E	G	A	T	V	E	L	A	A	H	I	A	G	Y	G	R	K	L	S	E	T	W	L	Y	O	W	M	K	A	509												
479	V	K	D	A	K	K	T	T	E	M	R	A	A	L	V	N	A	D	Q	T	L	S	E	T	W	S	Y	Q	L	P	A	N	E	511											

H	1	-----	0
H	1	MNKTTEYIDAMPIAASEKAALPKTDIRAVHQALDAEHR TWARED	44
H	1	-----	0
H	45	DSPQGSVKARLEQAWPDSLADGQLIKDDEGRDQLKAMPEAKRSS	88
H	1	-----	0
H	89	MFPDPWR TNPVGR FWDRLRGRDVT PRYLARLTKEEQESEQKWRT	132
H	1	-----MPAERRRRRAVTLASRLVAAAISLTAAAGAFF	31
H	133	VGTIRRYILLILT LAQT VVA TWYMKTILPYQG WALINPMDMVGG	176
H	32	LFLQFGSTDGLDSMDITRSV LILVSTSWLGWGAAHAVLG - - - L	71
H	177	DLWVSFMQLLPYMLQTGILILFAVLFVWVSAGFWTALMGFLQLL	220
H	72	FSR PQR PANV SP - - DAPIST - - RTVILV PVYNED PVATFSRIA A	111
H	221	IGRDKYSISAS TVGD EPLNPEHRTALIMPICNEDVNRVFAGLRA	264
H	112	MDASLAATPWRDLFHFAILSDTRDEAIAARERFWFLRLLRERDA	155
H	265	TWESVKA TGNAKHFDVYILSDSYNPDICVAEQKAWMELIAEVGG	308
H	156	EGRIFYRRRAVNRGRKAGNIEDFIQKSGSAYPFAVILDADSLME	199
H	309	EQIFYRRRRRRV KRKSGNIDDFCRRWGSQYSYMVVLDADSVMT	352
H	200	GETLVDMVRRMEAEPR LGLLOTLPVV - - - TKFGRSMOFSAALH	239
H	353	GDCLCGLVRLMEANPNAGIIOSSPKASGMDTLYARCOQFA TRVY	396
H	240	APVFARGLAMMQGR TGPFWGHNAIVRVQAF AESCGLPELSGPPP	283
H	397	GPLEFTAGLHFVQLGESHYWGHNAIIRVKPFI EHCALAPLPGE GS	440
H	284	FGGHVMSHDYVEAALLARAGWIVRFDDDIRGSEYEEG PENLV DHA	327
H	441	FAGSILSHDFVEAALMR RAGWGVWIA YDLP GSYEELPPNLLDEL	484
H	328	KRDRRWCQGNLQHGRILFAPGLCGWNR FVFLQGIMAYIAPLFWL	371
H	485	KRDRRWCHGNLMNFR LFLVKGMHPVHRAVFLTGVM SYLSAPLWF	528
H	372	GFIMASIAAPFFAPP LDYFPVPYWPFPVFP SDETWK - - - AIGLA	412
H	529	MFLALS TALQ - VVHALTEPQYFLQPRQLFPVWPQWRPELAIALF	571
H	413	VGIFGLLLLPKLMIAIEAIVTGRAAGFGGAGRVLVSLT LAELVFS	456
H	572	ASTMVL LFLPKL - LSI LLIWCKGTKEYGGFWRV TSLLLLEVLF S	614
H	457	SI IAPI LMAFO TRSVLQVL LGRDGGWPTNNRGDGSL SVAQAWS A	500
H	615	VLLA PVRMLFHTV FVVS AFLGWEV VWN SPQRDD DSTSWG EAFKR	658
H	501	SHWIVTWGLIGIGATYYFAPGLVPWL LPVALPMIFSP LVIAVTS	544
H	659	HGSQ LLLGLVWAVGMAWLDLRF LFWLAPIVFS LILSPFVSVISS	702
H	545	KRS - - - - R S A L F T M P L E V A P T P V L L A H D A I L A D W E - R S P A P E	581
H	703	RATVGLR TKR W K L F L I P E E Y S P P Q V L V D T D R F L E M N R Q R S L D D G	746
H	582	A V P - - - - - A L A V S H A	591
H	747	FMHAVFNPSFN A L A T A M A T A R H R A S K V L E I A R D R H V E Q A L N E T P	790
H	791	EKLNRDRRLVLLSDPVTMARLHFRVWNSPERYSSWVSYYEGIKL	834
H	835	NPLALRKPDAASQ	847

Fig. 3

MdoH MNKTTEYIDAMPAAASEKAALPKTDIRAVHQALDAEHRTWAREDDSPQGSVKARLEQAWPDSLADGQLIKDDEGRDQLKAMPEAKRSSMFPDPWRTNPNVG 100

OpgH MPAERRRRRAVTLASRLVAAAISLTAAGAFFLFLQFGSTDGLDSMDITRSVLILV 55

MdoH RFWDRLRGRDVTPRYLARLTKEEQESEQKWRTVGTIRRYILLILTLAQTVVATWYMKTILPYQGWALINPMDMVGQDLWVSFMQLLPYMLQTGILILFAV 200

OpgH STSWLGWGAHAHLG----LFSRPQR PANVSP--DAPIST--RTVILVRVYNEDPVATFSRIAAMDASLAATPWRDLFHFILSDTRDEAIAARERFWFL 147

MdoH LFCWVSAGFWTALMGFLQLLIGRDKYSISASTVGDEPLNPEHRTALIMPICNEDVNRVVFAGLRATWESVKATGNAKHFDVYILSDSYNPDICVAEQKAWM 300

OpgH RLLRERDAEGRIFYRRRAVNRRKAGNIEDFIQKSGSAYPFVILDADSLMEGETLVDMVRRMEAEPRGLLQTLPVV----TKFGRSMQFSAALHAPVF 243

MdoH ELIAEVGGEGQIFYRRRRRRVKKSGNIDDFCRRWGSQYSYMVVLDADSVMTGDCLCGLVRLMEANPNAGIIQSSPKASGMDTLYARCQQFATRVYGPFLF 400

OpgH ARGLAMMQGRTGPFWGHNAIVRVQAFAESCGLELPGPPPFGGHVMSHDYVEAALLARAGWIVRDDDIRGSYEEGPNLVDHAKRDRRWCQGNLQHGR 343

MdoH TAGLHFHWQLGESHYWGHNAIIRVKPFIEHCALAPLPGEGSFAGSILSHDFVEAALMRAGWGVWIAIDLPGSYEELPPNLLDELKRDRRWCHGNLMNFR 500

OpgH LFAPGLCGWNRVFLQGIMAYIAPLFWLGFIMASIAAPFFAPPLDYFPVYWPFPVPSDETWK---AIGLAVGIFGLLLPKLMIAIEAIVTGRAAGFG 440

MdoH FLVKGMHPVHRAVFLTGVMYSYLSAPLWFMFLALSTALQ-VVHALTEPQYFLQPRQLFPVWPQWRPELAIALFASTMVLLFLPKL-LSILLIWCKGTKEYG 598

OpgH GAGRVLVSTLAEVFSIIAPILMAFQTRSVLQVLLGRDGGWPTNRRGDGSLVAQAWSASHWIVTWGLIGIGATYYFAPGLVPWLLPVALPMIFSPPLVI 540

MdoH GFWRVTLSSLLEVLFSVLLAPVRMLFHTVFVVS AFLGWEVVWNSPQRDDSTSWGEAFKRHGSQLLLGLVWAVGMAWLDLRFVFLWLAIVFSLILSPFVS 698

OpgH AVTSKRS-----RSALFTMPLEVA PTPVLLAHDAI LADWE-RSPAPEAVP-----ALAVSHA 591

MdoH VISSRATVGLRTKRWKLFLIPEEYSPPQVLVDTDRFLEMNRQRSDDGFMHAVFNPSFNALATAMATARHRASKVLEIARDRHVEQALNETPEKLNDRDR 798

MdoH LVLLSDPVTMARLHFRVWNSPERYSSWVSYYEGIKLNPLALRKPDAASQ 847

The *opgC* and *opgGIH* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans

VIRGINIE COGEZ,¹ AGNES PUKAS,² EVGUENI GAK,²

SAMUEL KAPLAN,² AND JEAN-PIERRE BOHIN^{1*}

*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576,
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France¹,
and Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Texas Health Science
Center, Houston, Texas 77224².*

Running title: The *opgGIHC* operon of *R.sphaeroides*

*Corresponding author. Mailing address: U.S.T.L., Bât. C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Phone: +33 (0)3 20 43 65 92; Fax +33 (0)3 20 43 65 55.

E-mail: Jean-Pierre.Bohin@univ-lille1.fr

SUMMARY

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) of *Rhodobaeter sphaeroides* are anionic cyclic molecules that accumulate in large amount in the periplasmic space in response to low osmolarity of the medium. Their anionic character is provided by the substitution of the glucosidic backbone by succinyl residues from unknown origin. A wild type strain WS8 was subject to transposon mutagenesis, and putative mutant clones were screened for changes in the anionic character of OPGs by thin layer chromatography. One mutant deficient in succinyl substitution of OPGs was obtained and the gene inactivated in this mutant was characterized and named *opgC*. *opgC* is located downstream *opgGIH*, the genes governing the glucan backbone synthesis. Cassette insertions in *opgH* had a polar effect on glucan substitution, indicating that *opgC* is in the same transcription unit. Expression of *opgIHC* in *Escherichia coli mdoH* and *mdoB/mdoC* mutants allowed the production of slightly anionic and abnormally long linear glucans. Thus, the MdoC and OpgC proteins are functional homologues. Both are highly hydrophobic membrane proteins, but they do not show any primary sequence similarity.

INTRODUCTION

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are found in the periplasmic space of Proteobacteria (2, 12). These oligosaccharides exhibit quite different structures among various species but they share four common characteristics: i) a small size, with a degree of polymerization in the range of 5 to 24; ii) D-glucose being the only sugar unit; iii) β -glucosidic bonds being the main type of linkages; iv) the periplasmic concentration increasing in response to a decrease of environmental osmolarity. Four families of OPGs are described on the basis of structural features of the polyglucose backbone (2): family I, heterogeneously sized linear and branched β -1,2; β -1,6 glucans; family II, heterogeneously sized cyclic β -1,2 glucans; family III, homogeneously sized cyclic and branched β -1,3; β -1,6 glucans; family IV, homogeneously sized cyclic β -1,2; α -1,6 glucans. In several bacterial species, OPGs are moreover substituted by one or several of a series of different residues, originating from either the membrane phospholipids (phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and phosphocholine) or from the intermediate metabolism (acetyl, succinyl, and methylmalonyl). Thus, depending on the bacterial strain and growth conditions, OPGs can be found unsubstituted, neutral or anionic.

The function of OPGs in the bacterial envelope remain obscure. However, mutants defective in OPG synthesis have a highly pleiotropic phenotype, indicative of an overall alteration of their envelope properties. When the particular bacterium interacts with a eucaryotic host, as a pathogen or a symbiont, mutants defective in the backbone synthesis are partially or completely impaired in this interaction (2). This is the case for mutants of *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *P. aeruginosa*, and *Erwinia chrysanthemi* (1, 3, 16, 17, 19, 21). One highly attenuated *Salmonella enterica* mutant resulted from a transposon insertion in the *mdoB* gene known to

govern OPG substitution by phosphoglycerol in *Escherichia coli* (32). In contrast, a *S. meliloti* mutant impaired in OPG substitution by phosphoglycerol effectively nodulated alfalfa (4), but the anionic character of these OPGs was more or less retained by an increase of succinyl substitution. Obviously, further genetic analyses of different model organisms are needed to understand the OPG function(s).

Rhodobacter sphaeroides is a photoheterotrophic bacterium of the alpha subdivision of the Proteobacteria whose genome is composed of two distinct circular chromosomes (29). Genetic analysis was highly developed in this organism which is a model for study of bacterial photosynthesis (20). *R. sphaeroides* produces OPGs belonging to the family IV. They mainly consist of a cyclic glucan homogenous in size (DP=18) in which 17 glucose units are linked by β -1,2 linkage and one glucose unit is linked by α -1,6 linkage. This backbone is substituted to various degree by two kinds of residues: O-acetyl residues (0 to 2 per mol) and O-succinyl residues (1 to 7 per mol) which confer a highly anionic character to these OPGs (30).

Our initial purpose was to obtain OPG defective mutants by screening a transposon insertion library with a thin layer chromatographic assay (13). A single mutant clone was detected which produced neutral OPGs. Actually, this particular phenotype allowed the demonstration of acetyl substitution of OPGs (30). The transposon insertion was located just downstream of genes similar to the *E. coli mdoGH* operon which govern the synthesis of OPGs belonging to the family I. These genes, *opgGIH*, were demonstrated to be necessary for OPG backbone synthesis (22). In this paper we describe the molecular and functional characterization of this new gene, *opgC*, necessary for OPG succinylation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and media. Bacterial strains are described in Table 1. Bacteria were grown at 30°C (*R. sphaeroides*) or at 37°C (*E. coli*) in Luria broth (LB; 18). When low osmolarity medium was required, LB without NaCl or low-osmolarity medium (LOS; 15) was used. Solid media were obtained by adding agar (15g/liter). Antibiotics were added to the medium at the following concentrations: kanamycin (Kan), 25µg/ml; streptomycin (Str), 100µg/ml; tetracycline (Tet), 2.5µg/ml; trimethoprim (Tmp), 50µg/ml for *R. sphaeroides* and ampicillin (Amp), 50µg/ml; chloramphenicol (Cml), 25µg/ml; kanamycin, 50µg/ml; trimethoprim, 50µg/ml for *E. coli*.

Transformation and mating. *E. coli* cells were made competent and transformed using the rubidium chloride technique (10). The broad host range plasmids (originating from pRK415 or pLA2917) were mobilized from S17-1 into *R. sphaeroides* strains. Matings were performed on nitrocellulose filters laid on LB plates and the exconjugants selected on LB Tet, Tmp or Kan.

Transposon mutagenesis. The mobilizable suicide plasmid pSUPTn5TpMCS (6, 24) was introduced into *R. sphaeroides* WS8 by mating at 30°C with *E. coli* S17-1 and spread onto LB Tmp Str plates. After a 3-day incubation, clones of *R. sphaeroides* containing transposon insertions (conferring trimethoprim resistance) were picked and arranged to constitute libraries of putative mutants.

Thin-layer chromatographic screening method. Each Tn5TpMCS mutant generated from WS8 was screened for production of OPGs as described previously (13). Chromatography was realized onto aluminium silica gel 60 plates (Merk) in

ethanol/butanol/water (5/5/4) solvent. Glucans were revealed by spraying dried plates with 0.2% orcinol in 20% sulfuric acid followed by heating at 110°C.

DNA purification, restriction and modification enzymes and ligase. Standard procedures (25) were used for large scale plasmid isolation and rapid analysis of recombinant plasmids. Genomic DNA extraction was done as described by Davis et al. (8). Restriction endonucleases (Eurogentec), the large (Klenow) fragment of DNA polymerase I and T4 DNA ligase (Gibco BRL) were used according to manufacturer's recommendations.

***In vitro* construction of plasmids.** For the sequencing of a fragment of the *opgC* gene, a genomic DNA fragment of the *opgC1::Tn5TpMCS* strain NFB4000 was cloned in the *EcoRI* site of plasmid pUC19 (Amp^r). This restriction enzyme cut once in the Tn5TpMCS DNA outside the gene conferring trimethoprim resistance to the transposon. Trimethoprim resistant clones harboring a plasmid containing a 6 kb DNA insert were isolated on plates containing trimethoprim and ampicillin. In this plasmid, called pNFR2, a translational fusion occurred fortuitously between the eighteenth codon of the α -*lacZ* fragment present in the vector and the third codon of *opgI*, while *opgH* was intact and *opgC* inactivated.

For the complementation tests in *R. sphaeroides*, a 4.5 kb *SalI* fragment from pUI8166 (22), containing an intact copy of *opgC* (*opgH* being truncated), was inserted into the *SalI* site of pUC19 to give pNFR12. The 4.5 kb fragment was then liberated by digesting pNFR12 with *HindIII* and *KpnI* and inserted into the broad host rang mobilizable vector pRK415 (Tet^r, 11) digested with *HindIII* and *KpnI*, to give pNFR13 (Fig. 3).

A 5 kb *ApaI-BalI* fragment from PUI8166, containing an intact copy of *opGIH* (*opgC* being truncated), was blunt ended and inserted into the *SmaI* site of pUC19, to give pNFR14. Then, the 5 kb fragment was liberated by digesting pNFR14 with *HindIII* and *KpnI*, and

opgGIHC of *R.sphaeroides* - 7

inserted into the broad host rang mobilizable vector pRK415 digested with *HindIII* and *KpnI*, to give pNFR21 (Fig. 3).

A 1.8 kb *StuI-SmaI* fragment from pNFR12, containing *opgC*, was inserted into the *SmaI* site of pUC19 to give pNFR18. The 1.8 kb fragment was then liberated by digesting pNFR18 with *KpnI* and *SmaI*, and inserted into the expression vector pYZ4 (Kan^r, 16) to give pNFR25 (Fig. 3).

A 3 kb *EcoRI* fragment from pNF14, containing *opgIH*, was inserted into the *EcoRI* site of pUC19 in the same orientation as α -*lacZ*, to give pNFR35 (Fig. 3). A 2.2 kb *HindIII-BglII* from pNFR35 and a 1.2 kb *BglII-EcoRI* from pNFR25 were ligated together and inserted into the sites *HindIII* and *EcoRI* of pUC19, to give pNFR37 (Fig. 3). This plasmid is similar to pNFR2 except that *opgC* is now intact.

A 4 kb *EcoRI-HindIII* fragment from pNFR2 was blunt ended and inserted into the *SmaI* site of pYZ4, to give pNFR30.

DNA sequencing. DNA sequences were determined with the Sequenase version 2.0 kit (USB corporation) except for the Tn5 insertion point where the oligonucleotide 5'-CATGGAAGTCAGATCCTGG-3' (Eurogentec), corresponding to the end of both IS50 delineating Tn5 was used as a primer. The DNA sequences and deduced amino acid sequences were analyzed by using computer programs made available from Infobiogen (<http://www.infobiogen.fr/>) and from ERGO (<http://wit.integratedgenomics.com/IGwit/CGI/>).

Analysis of OPGs from *R. sphaeroides*. Cultures (100 ml) of *R. sphaeroides* were grown overnight in LB without NaCl. After 20 min centrifugation at 10,000 x g, OPGs were extracted by 70% ethanol from the cell pellets. The extracts were concentrated by rotary evaporation, and lipids and proteins were then removed by the addition of a mixture of chloroform and methanol (2:1). The aqueous phase, containing OPGs, was chromatographed

on a Biogel P4 column (BioRad). The column (1.5 cm in section, 68 cm in height) was equilibrated with acetic acid 0.5% and eluted at a rate of 15 ml/h in the same buffer. Fractions (1.5 ml) containing OPGs were pooled, concentrated by rotary evaporation, desalted on a Biogel P2 column (Bio-Rad), and fractions containing OPGs were pooled and lyophilized. Sugar content was determined colorimetrically by using the anthrone-sulfuric acid reagent procedure (27).

Analysis of OPGs from *E. coli*. Strain NFB1933 and its derivatives were grown in LOS medium (5 ml) supplemented with 0.24 mM D-[U-¹⁴C]glucose (125 MBq/mmol). OPGs were extracted by the charcoal adsorption procedure (15). Pyridine extract obtained by this procedure was chromatographed on a Biogel P4 column (Bio-Rad) and then on DEAE-Sephacel column (Pharmacia).

Determination of neutral and anionic characteristics of OPGs. OPGs were desalted on a PD10 column (Pharmacia) and equilibrated with a Tris-HCl 10mM pH7.4 buffer. OPG containing fractions were pooled and chromatographed on a DEAE-Sephacel (Pharmacia) column (1.5 cm in cross section, 38 cm in height) equilibrated with Tris-HCl 10mM pH7.4 and eluted with the same buffer containing increasing concentrations of NaCl ranging from 0M to 0.2M by steps of 0.05M. A volume of 60 ml was used for each NaCl concentration and the volume of each collected fraction was 4 ml.

Matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry (MS). To remove all substituents, 250 µg glucose equivalent of lyophilized OPGs (from *E. coli*) were dissolved in 100 µl of fluorhydric acid (HF) and left for 60 hours at 4°C. OPGs were then neutralized by the addition of seven volumes of saturated lithium hydroxide (LiOH) solution. The LiF precipitate was separated by centrifugation and washed several times. The different supernatants were pooled and neutralized with AG 50W-X8 (H⁺ form, Bio-Rad), and then

desalted on a Biogel P2 column (Bio-Rad). Fractions containing OPGs were pooled and lyophilized.

The matrix used for carbohydrates analysis was 3-aminoquinolin (10 g/liter in water; 28). Lyophilized oligosaccharides samples were redissolved in doubly distilled water and then diluted with an appropriate volume of the matrix solution (1:5, v/v). 1 μ l of the resulting solution was deposited onto a stainless steel target, and the solvent was evaporated under gentle stream of warm air.

The experiments were carried out on a VISION 2000 (Finnigan MAT) time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm wavelength and a 3 ns pulse width). After selection of the appropriate site on the target by a microscope, the laser light was focused onto the sample/matrix mixture at an angle of 15° and at a power level of 106 to 107 W/cm². Positive ions were extracted by a 5 to 10 keV acceleration potential, focused by a lens and the masses separated in a Reflectron time of flight instrument. At the detector, ions were postaccelerated to 20 keV for maximum detection efficiency. The resulting signals were recorded with a fast transient digitizer with a maximum of 2.5 ns channel resolution, and transferred to a PC for accumulation, calibration, and storage. All MALDI mass spectra are the result of a 20 single-shot accumulation.

RESULTS

Isolation of a mutant with altered phenotype of OPGs. A random Tn5TpMCS mutagenesis was performed in the *R. sphaeroides* WS8 strain and glucans extracted from 436 random Tn5TpMCS insertion mutants were analyzed by thin layer chromatography to find one clone (Fig. 1, lane 2) whose OPGs showed a slower migration when compared to the wild type (Fig. 1, lane 1). This clone was called NFB4000.

Mild alkali treatment of OPGs removes substituents attached to the glucan backbone by O-ester linkages. As expected, treated wild-type OPGs (Fig. 1, lane 3) exhibited a reduced migration similar but not identical to that of mutant OPGs (Fig. 1, lane 2). To observe identical migration between the two types of OPGs, mild alkali treatment of the mutant OPGs was necessary (Fig. 1, lane 4). The growth rates and yields of the two strains at low osmolarity were identical. The OPG amounts were also identical, indicating that the change observed was not the consequence of a reduction in the glucose backbone synthesis.

OPGs isolated from the mutant are neutral. OPGs produced by the mutant and wild-type strains were further analyzed by DEAE-Sephacel chromatography which allow the separation of subfractions of glucan by their anionic character. OPGs extracted from WS8 were separated into five main subfractions eluted at increasing NaCl concentration higher than 100 mM, showing their highly anionic character (Fig. 2). OPGs produced by wild-type *R. sphaeroides* are essentially homogeneous in size with a degree of polymerization of 18 glucoses (30). There are substituted to various degrees with succinyl residues which are negatively charged at pH 7.4, and acetyl residues which are neutral at this pH. Thus, one could expected that each subfraction separated by DEAE-Sephacel corresponded to an increasing number of succinyl residues. The second, third and fourth subfractions were collected

separately, desalted and analyzed by MALDI-mass spectrometry. This analysis revealed that these subfractions were still heterogeneous with different degrees of substitution by succinyl residues (data not shown). Thus, we must consider that each subfraction corresponded to a different charge-to-mass ratio due to various levels of substitution by succinyl and acetyl residues.

OPGs extracted from NFB4000 were not adsorbed on the DEAE-Sephacel column, showing their neutral character (Fig 2). An accurate structural analysis revealed that OPGs from NFB4000 were lacking succinyl residues but were still substituted by acetyl residues (30). The gene interrupted by the Tn5TpMCS insertion was called *opgC*, by analogy with the *mdoC* gene which governs OPG succinylation in *E. coli* (13).

***opgC* lies downstream from the *opgGIH* operon.** The *opgC1::Tn5TpMCS* mutation was cloned into the pUC19 plasmid vector from the genomic DNA using the trimethoprim resistance conferred by the transposon as a selection. Several clones were obtained which contained plasmids with the same 6 kb insert in one or the other orientation. The DNA sequence of this 6 kb insert was determined using a primer from within the IS50 DNA (see Materials and Methods). Comparison of this sequence with the available sequence data from *R. sphaeroides* indicated that actually *opgC* corresponded to an open reading frame found downstream from *opgH* (Fig. 3) and present in the pUI8166 cosmid originating from the *R. sphaeroides* 2.4.1 strain (22). When this cosmid was introduced into the mutant strain NFB4000, the restoration of the anionic character of OPGs was observed by thin layer chromatography (data not shown). The *opgC* gene was further sub-cloned as a 4.5 kb *SaII* fragment in plasmid pNFR13 which still complement the NFB4000 defect.

***opgC* is co-transcribed with *opgH*.** Tn5TpMCS was found inserted 747 nucleotides downstream from a putative start codon ATG, itself located 5 nucleotides before the stop

codon (TGA) of *opgH*. The *opgC* open reading frame ends at a TGA codon and encode a 399 amino acid polypeptide. Open reading frame overlapping strongly suggests co-transcription. One experiment was done to corroborate this hypothesis. During the study of the *opgGIH* locus, a *kan* cassette had been inserted into *opgH* in both orientations and the two mutations were introduced into the chromosome (21). pNFR21 containing only *opgGIH* (see Materials and Methods) was introduced into the two *opgH::kan* mutants (EG7 and EG18) and OPGs were extracted and analyzed by thin layer chromatography. The OPGs were anionic when the cassette was inserted in the *opgH* gene orientation but neutral when the cassette was in the opposite orientation, with a polar effect on *opgC* expression. When the pUI8166 cosmid was introduced into the EG7 and EG18 strains, both synthesis and anionic substitution of the OPGs were restored whatever the cassette orientation (data not shown).

OpgC of *R. sphaeroides* and MdoC of *E. coli* are homologous protein with no sequence similarities. As shown previously (22), OpgG and OpgH (the products of the genes *opgG* and *opgH*) present a high degree of sequence similarities with MdoG and MdoH of *E. coli* (53 and 58% on the major part of the proteins, respectively). In contrast, while OpgC and MdoC have similar sizes (399 and 385 amino acids, respectively) they do not show any significant sequence similarities. However, OpgC and MdoC exhibit stretches of hydrophobic amino acids over its entire length. For MdoC (13), 10 transmembrane segments have been predicted by the TopPred2 program (<http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/>). For OpgC, the same program allowed the prediction of 11 transmembrane segments. Thus, highly similar proteins are implicated in the synthesis of quite different glucosidic backbones (belonging to families I and IV), but membrane proteins, with no sequence similarities, are probably implicated in the same transfer of succinyl residues through the cell membrane up to OPGs

present in the periplasmic space (13). The open question was whether the *R. sphaeroides* genes can be expressed in *E. coli*, and what properties they confer in this context.

***opgIH* of *R. sphaeroides* can complement a *mdoH* mutation in *E. coli*.** Several difficulties could be envisaged while trying to express *R. sphaeroides* genes in *E. coli*. Since long ago, we know that *R. sphaeroides* genes possess transcriptional specificity which makes difficult their heterologous expression in *E. coli*, even in an in vitro system (5). Moreover, the first gene of this locus is a periplasmic protein translated with a signal-peptide which could not be recognized by the *E. coli* secretory machinery. Actually, the introduction of pUI8166 in *mdoG* or *mdoH* mutants of *E. coli* failed to restore any OPG synthesis (data not shown). Placing the *opgGIH* genes downstream the *lac* promoter in pUC19 (pNFR14) was also unsuccessful. However, when pNFR2 was introduced into a *mdoH200::Tn10* strain, material corresponding to what is expected for OPGs was detected by thin layer chromatography. Sequence data examination revealed that, in this plasmid, a translational fusion should have fortuitously occurred between the eighteenth codon of the α -*lacZ* fragment present in the vector and the third codon of *opgI*, thus allowing the expression of the downstream *opgH* gene. This was confirmed with the construction of pNFR30 where an *opgIH*-containing fragment with cohesive ends was blunt ended using the Klenow fragment of DNA polymerase I (see Materials and Methods). Among plasmids presenting the correct orientation of insert with respect to the *lac* promoter, some were able to complement a *mdoH* mutation, others not.

We decided to compare the effects of introducing in a *mdoH* mutant plasmids pNFR30 and pNF309 where *opgIH* and *mdoH*, respectively, are governed by the *lac* promoter in the same vector. OPGs were extracted and analyzed by gel filtration chromatography. The amount of OPGs was three time lower with pNFR30 than with pNF309. Since OPG synthesis is increased by a 1.5 factor when *mdoH*⁺ is present on a multicopy plasmid like pNF309 (9), the

level observed with *R. sphaeroides* genes was considered as the result of a good complementation. The OPGs produced by the two strains were treated to remove all substituents and then subjected to a MALDI-mass spectrometry analysis. With pNF309, the spectra were characteristic of linear-branched glucans found in *E. coli*, with a degree of polymerization (DP) of 5 to 14 glucose residues, the three principal species containing 6, 7, and 8 glucose residues (Fig. 4A). One should notice that the presence of pNF309 induced a slight increase of the maximal DP observed normally (2). With pNFR30, the spectra were very similar but the maximal DP was at least of 18 glucose units and the principal species contained 5, 6, 7, 8, and 9 glucose residues (Fig. 4B).

OpgC of *R. sphaeroides* transfers succinyl residues to OPGs in *E. coli*. The highly anionic character of OPGs synthesized by *E. coli* is due to the presence of phosphoglycerol and succinyl residues. Two genes *mdoB* and *mdoC* govern these two kind of substitution and a *mdoB mdoC* double mutant produce neutral OPGs (13). To test the transfer ability of OpgC in a heterologous context, pNFR37 (Fig. 3) was introduced in strain NFB1933. We had previously observed that pNFR12 which contains only *opgC* was ineffective. Plasmid pNFR37 is expected to express *opgI* as translational fusion with α -*lacZ* and *opgH*, and *opgC* which overlaps *opgH*. The specifically labeled OPGs produced in presence of pNFR37 were purified and analyzed by DEAE-Sephacel chromatography. Twenty percents of the radioactivity, corresponding to anionic glucans, were retained by the column and were eluted into two sub-fractions by increasing the ionic strength (Fig. 5).

DISCUSSION

This paper describe the random isolation of a *R. sphaeroides* mutant defective in OPG succinylation. No OPG defective mutants (our initial purpose) were observed with this procedure as it was already the case while screening potential mutants in *S. meliloti* (4), *E. coli* (13), and *E. chrysanthemi* (V. Coge, and J.-P. Bohin, unpublished data), and the reason of this fact remains unknown. The gene inactivated in the mutant, *opgC*, was then isolated and characterized. OpgC is a highly hydrophobic protein, most probably inserted in the cell membrane. As we have previously postulated for MdoC, OpgC should transfer succinyl residues, probably provided by the succinyl-CoA pool, through the membrane, up to the OPGs accumulating in the periplasmic space (13). The *opgC* gene overlaps *opgH* and a polar mutation in *opgH* prevent *opgC* expression. Thus, *opgC* form an operon with *opgIH*.

When expressed together, OpgI and OpgH can complement a *mdoH* mutation in *E. coli*. That means that proteins that normally catalyze the synthesis in *R. sphaeroides* of β -1,2; α -1,6 cyclic glucans made of 18 glucose residues can catalyze the synthesis in *E. coli* of β -1,2; β -1,6 linear glucans made of a various number (5 to 18) of glucose residues. The small open reading frame of *opgI* was found necessary to OPG synthesis in *R. sphaeroides* (16). In *E. coli*, *opgI* is most probably necessary too, but we cannot exclude that translational coupling is necessary to *opgH* expression. OpgH is shorter than MdoH, and OpgI appears to correspond to the N-terminal domain of MdoH (9), a domain poorly conserved among the different homologues found in Proteobacteria (2). One should notice that an other small protein, the acyl carrier protein, participates in OPG synthesis in *E. coli* (31). MdoH and OpgH have typical motives found in glycosyl transferases and we can imagine that both proteins catalyze the polymerization of long chain of β -1,2 glucose residues. We have previously postulated that this

kind of proteins, embedded in the membrane by a number of trans-membrane segments, could be directly involved in the translocation of the nascent chains to the periplasmic face of the membrane (9). There, other proteins like MdoG or OpgG would rearrange this backbone to add branches (MdoG) or made a cycle (OpgG). Since mutants of this second protein does not accumulate any glucan molecules (16, 22), the periplasmic and the membrane-bound proteins must interact in a very coordinate way during the process. Thus, the abnormal control of the degree of polymerization for OPG synthesized when *R. sphaeroides opgIH* genes were expressed would be the result of a partially defective interaction between MdoG and OpgH. Until now, we did not obtain the expression of OpgG in *E. coli*. This experiment will be important to determine to what extent this protein determine the structural differences between the OPGs produced by the two different bacterial species.

When expressed together with OpgI and OpgH, OpgC can transfer charged residues to OPGs in *E. coli*. Together with the loss of succinyl transfer in the *opgC* mutant, this is a confirmation that OpgC is an OPG-succinyl transferase. However, this activity remained at a low level in *E. coli*, especially if we consider the highly anionic character of *R. sphaeroides* OPGs. Two kind of hypotheses, not mutually exclusive, can be formulated to explain this observation: those regarding the protein organization in the membrane and those regarding the substrate specificity.

As already mentioned above, OpgC and MdoC are two functional homologues which do not share significant amino acid sequence similarity. In *E. coli*, succinylation occurred very early in the OPG biosynthetic process, most probably while nascent polyglucose chain are still attached or in the close vicinity of the backbone synthetic enzymes (Y. Lequette and J.-P. Bohin, unpublished data). Primary substitution by phosphoglycerol residues is catalyzed by an other membrane bound protein, while secondary substitution is determined by a periplasmic

enzyme (12). There is no information on the protein which catalyzes the phosphoethanolamine transfer. Thus, at least 3 or 4 membrane proteins could stably interact with each other and with several periplasmic proteins, and form a complex OPG synthetic machinery. If this is true, one can envisage that heterologous proteins cannot interact correctly, and as a consequence, that their activities are lowered.

OpgC expression was obtained together with OpgI and OpgH in a *mdoH*⁺ background, and the OPG backbones produced were highly heterogeneous in size, and probably in the number and position of branches (7). Since OPGs produced in *R. sphaeroides* do not possess branches, the succinyl transfer should occur on glucose residues attached to other residues only by β -1,2 linkages, before or after cyclization of the molecules. Therefore, only small subfractions of the OPGs produced in *E. coli* could be recognized as substrates for the *R. sphaeroides* OPG-succinyl transferase.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jérôme Lemoine for the recording of MALDI-MS spectra.

This research was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR8576) and the Ministère de l'Education nationale, de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

1. Bahgwat, A. A., A. Mithöfer, P. E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel, and D. L. Keister. 1999. Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-3)- β -glucosyl. *Plant Physiol.* **119**:1057-1064.
2. Bohin, J.-P. 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:11-19.
3. Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58**:145-161.
4. Breedveld, M. W., J. A. Hadley, and K. J. Miller. 1995. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**:6346-6351.
5. Chory, J., and S. Kaplan. 1982. The in vitro transcription-translation of DNA and RNA templates by extracts of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Optimization and comparison of template specificity with *Escherichia coli* extracts and in vivo synthesis. *J. Biol. Chem.* **257**:15110-21.
6. Choudhary, M., R. C. Mackenzie, K. Nereng, E. Sodergren, M. G. Weinstock, and S. Kaplan. 1994. Multiple chromosomes in bacteria: structure and function of chromosome II of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **176**:7694-7702.
7. Cogez, V., P. Talaga, J. Lemoine, and J.-P. Bohin, J.-P. 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**:0000-0000.
8. Davis, R. W., D. Botstein, and J. R. Roth. 1980. Manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
9. 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.
10. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
11. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191-197.

12. **Kennedy, E. P.** 1996. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) in *Escherichia coli*, p. 1064-1071. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. **Lacroix, J.-M., E. Lanfroy, V. Coge, Y. Lequette, A. Bohin and J.-P. Bohin.** 1999. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **18**:3626-3631.
14. **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.
15. **Lacroix, J.-M., M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin.** 1989. Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**:1173-1182.
16. **Loubens I., L. Debarbieux, A. Bohin, , J.-M. Lacroix, and J.-P. Bohin.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **10**:329-340.
17. **Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G Rahme, and F. M. Ausubel.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47-56.
18. **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 Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
19. **Mukhopadhyay, P., J. Williams, and D. Mills.** 1988. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **170**:5479-5488.
20. **Oh, J.-I., and S. Kaplan.** 2001. Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. *Mol. Microbiol.* **39**:1116-1123.
21. **Page, F., S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy and J.-P. Bohin.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **000**:0000-0000.

22. Puskas, A., E. P. Greenberg, S. Kaplan, and A. L. Schaefer. 1997. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **179**:7530-7537.
23. Puskas, A., V. Cogež, E. Gak, J.-P. Bohin, and S. Kaplan. Osmoregulated periplasmic glucan production in *Rhodobacter sphaeroides* : Analysis of the structure and function of the *opg* locus. (submitted to *European Journal of Biochemistry*)
24. Sasakawa, C., and M. Yoshikawa. 1987. A series of Tn5 variants with various drug-resistance markers and suicide vector for transposon mutagenesis. *Gene* **56**:283-288.
25. Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor Laboratory Press.
26. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. Abroad-host-range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:37-45.
27. Spiro, R. G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* **8**:3-27.
28. Stahl, B., S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, and G. Sawatzki. 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **223**:218-226.
29. Suwanto, A., and S. Kaplan. 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome : presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **171**:5850-5859.
30. Talaga, P, V. Cogež, J.-M. Wieruszkeski, B. Stahl, J. Lemoine, G. Lippens, and J.-P. Bohin. Osmoregulated periplasmic glucans of *Rhodobacter sphaeroides*. (submitted to *European Journal of Biochemistry*)
31. 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.
32. Valentine, P. J., B. P. Devore, and F. Heffron. 1998. Identification of three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect. Immun.* **66**: 3378-3383.

opgGIHC of *R.sphaeroides* - 21

1. TABLE 1. Bacterial strains and plasmid used in this study.

Strains	Relevant genotype	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i> RP4 plasmid integrated Tc::Mu-Km::Tn7	(26)
DH5 α	F ⁻ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 glnV44 relA1 ΔlacU169 λ</i>	Lab stock
NFB216	Δ (<i>lac-pro</i>) <i>ara mdoH200::Tn10 pyrC46 rpsL thi</i> (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15)	(15)
NFB702	Δ (<i>lac-pro</i>) <i>ara mdoG202::neo pyrC46 rpsL thi</i> (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15)	(14)
NFB1933	<i>his pgi::Mu Δ(zwf-edd)1 eda-1 rpsL mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5</i>	(13)
NFB1100	pNF309/NFB216	(16)
NFB4234	pNFR30/NFB216	This work
NFB4245	pNFR37/NFB1933	This work
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
2.4.1	Wild type	Lab stock
WS8	Wild type, Str ^r strain	Lab stock
EG7	2.4.1 <i>opgH7::kan</i> , opposite to gene orientation	(22)
EG18	2.4.1 <i>opgH18::kan</i> , gene orientation	(22)
NFB4000	WS8 <i>opgC1::Tn5TpMCS</i>	This work
NFB4002	pUI8166/NFB4000	This work
NFB4004	pNFR13/NFB4000	This work
NFB4013	pNFR21/EG7	This work
NFB4014	PNFR21/EG18	This work

FIGURE LEGENDS

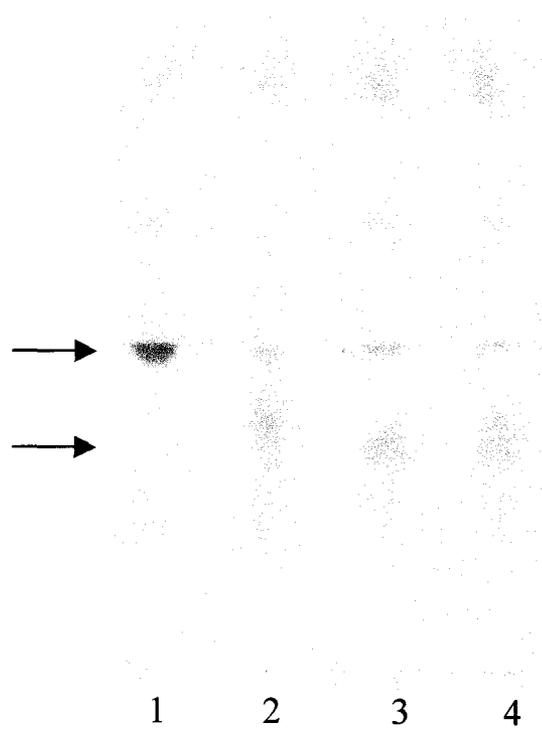
FIG. 1. Thin layer chromatographic analysis of OPGs extracted from WS8 (wild type, lanes 1 and 3) or NFB4000 (*opgCl::Tn5TpMCS*, lanes 2 and 4). Extracts were applied directly to thin-layer chromatography plates (lanes 1 and 2) or first subjected to mild alkali treatment to remove substituents attached by O-ester linkages (lanes 3 and 4). Arrows on the left side indicate the position of three different levels of OPG substitution .

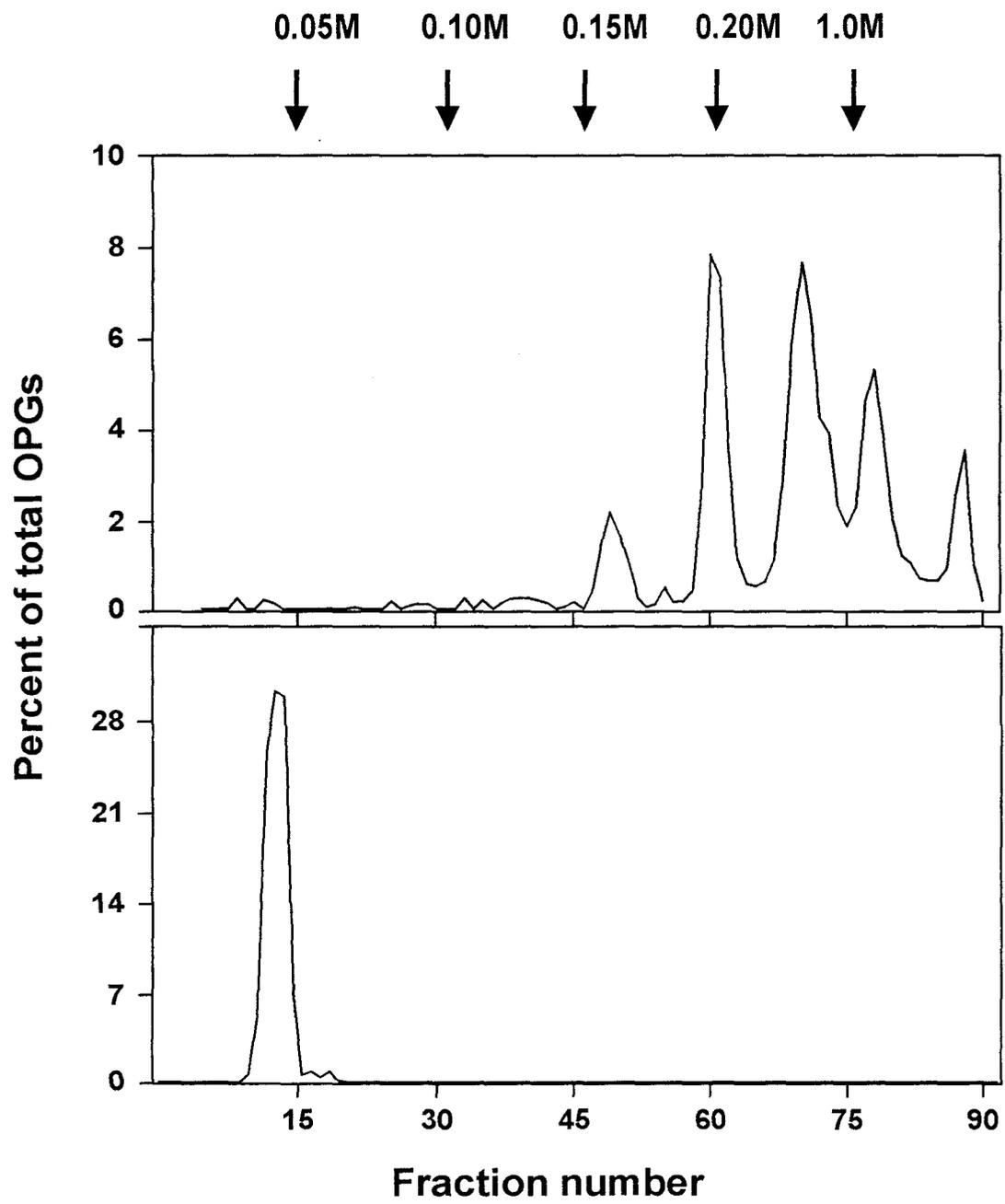
FIG. 2. DEAE-Sephacel anion exchange column chromatography profiles of OPGs from strains WS8 (Top) and NFB4000 (Bottom). Ionic strength was increased by steps of 0.05M NaCl at fractions indicated by the arrows. Fractions (4ml) were collected and sugar content was determined colorimetrically (see Materials and Methods). The concentration of each fraction is indicated as percent of the total fractions.

FIG. 3. Restriction map of a 8 kb fragment present in pUI8166 and its derivatives. Arrows indicated open reading frames of *opgGIHC*. Horizontal bars indicate the structure of the various inserts of the relevant plasmids. Restriction sites: A: *ApaI*, B: *BglII*, E: *EcoRI*, L: *BalI*, S: *SalI*; T: *StuI*, Z: *SmaI*.

FIG. 4. Positive-ion MALDI mass spectra of OPGs extracted from *E. coli* strains NFB1100 (*mdoH⁺/mdoH*, panel A) or from NFB4234 (*opgI⁺H⁺/mdoH*, panel B). Mass assignments are based on an external calibration.

FIG. 5. DEAE-Sephacel anion exchange column chromatography profiles of [U-¹⁴C] glucose labeled OPGs from strain NFB4245 (*opgI⁺H⁺C⁺/mdoC mdoB*). Ionic strength was increased by steps of 0.05M NaCl at fractions indicated by the arrows. Fractions (4ml) were collected and radioactivity was determined on aliquots.





0 1 2 3 4 5 6 7 8 kb

Tn5TpMCS

SE AT T T B E Z E S T B L Z L A S

G

C

I

H

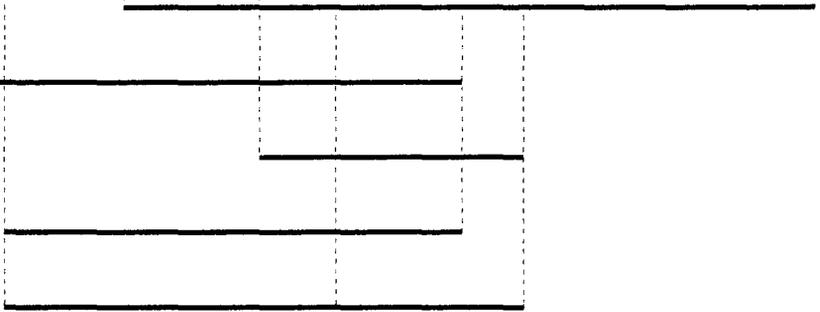
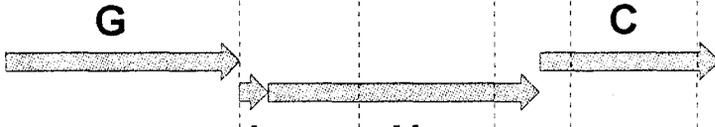
pNFR13

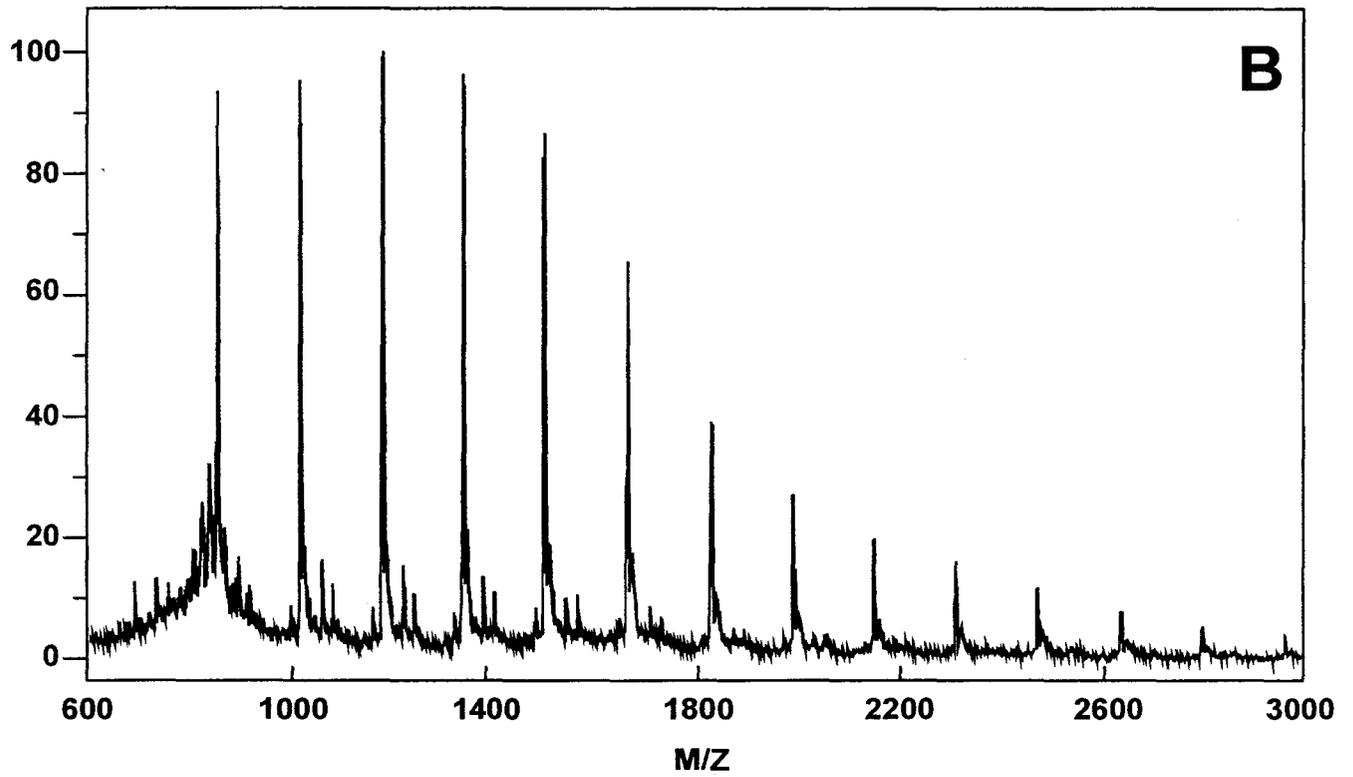
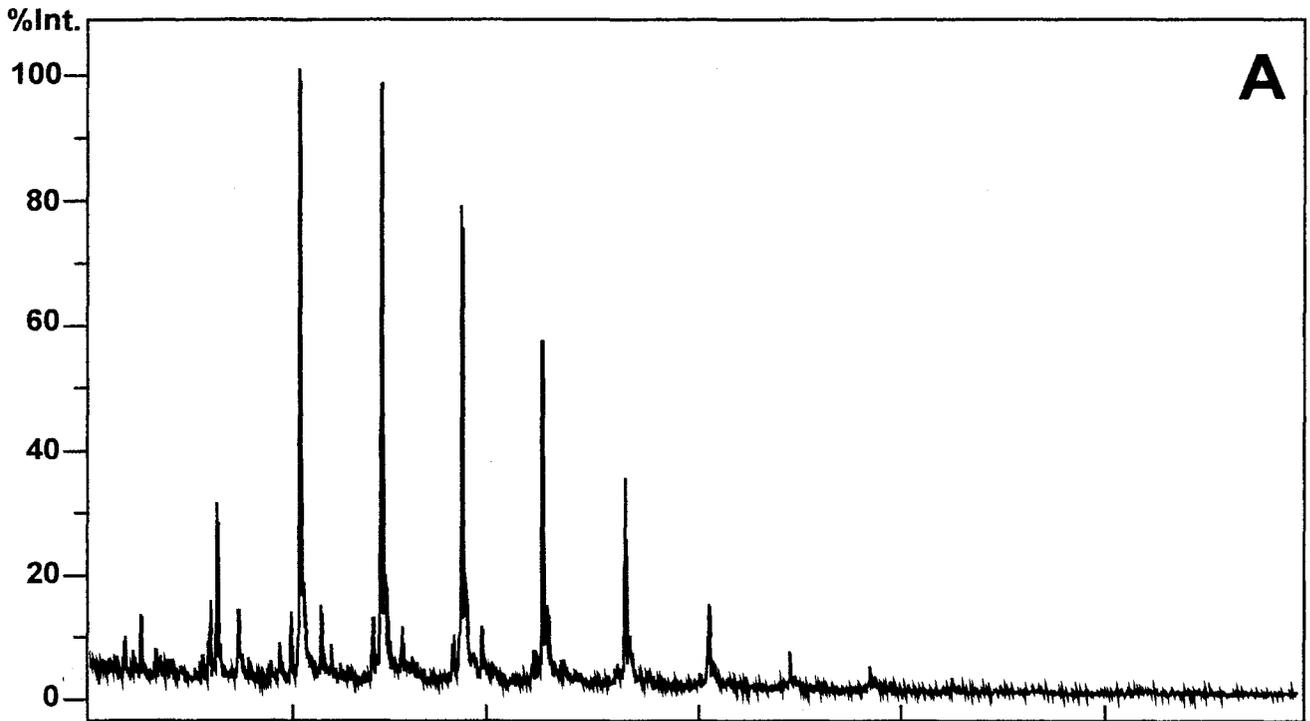
pNFR21

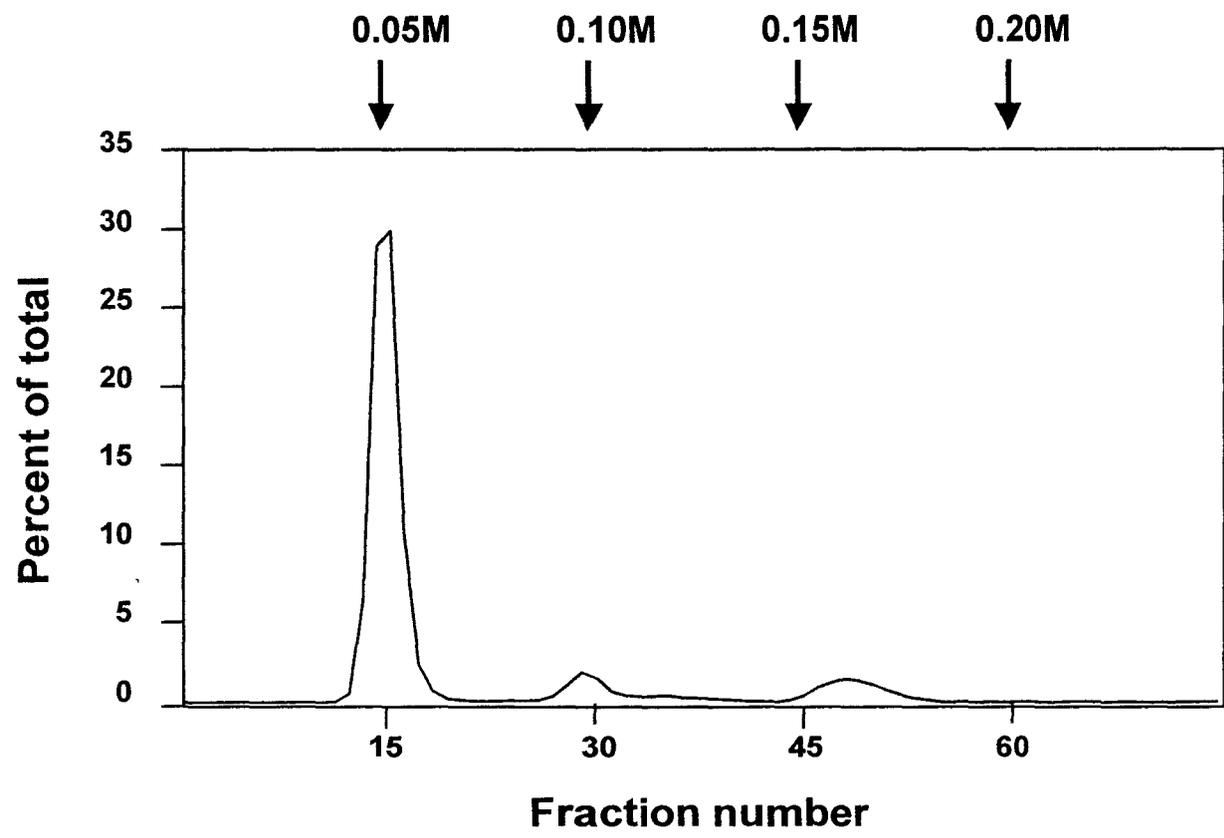
pNFR25

pNFR35

pNFR37







Osmoregulated Periplasmic Glucans of *Erwinia chrysanthemi*

VIRGINIE COGEZ, PHILIPPE TALAGA, JEROME LEMOINE, AND JEAN-PIERRE BOHIN*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 5 December 2000/Accepted 6 March 2001

We report the initial characterization of the osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) of *Erwinia chrysanthemi*. OPGs are intrinsic components of the bacterial envelope necessary to the pathogenicity of this phytopathogenic enterobacterium (F. Page, S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy and J.-P. Bohin, *J. Bacteriol.* 183:0000–0000, 2001 [companion in this issue]). OPGs were isolated by trichloroacetic acid treatment and gel permeation chromatography. The synthesis of these compounds appeared to be osmoregulated, since lower amounts of OPGs were produced when bacteria were grown in media of higher osmolarities. However, a large fraction of these OPGs were recovered in the culture medium. Then, these compounds were characterized by compositional analysis, high-performance anion-exchange chromatography, matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance analyses. OPGs produced by *E. chrysanthemi* are very heterogeneous at the level of both backbone structure and substitution of these structures. The degree of polymerization of the glucose units ranges from 5 to 12. The structures are branched, with a linear backbone consisting of β -1,2-linked glucose units to which a variable number of branches, composed of one glucose residue, are attached by β -1,6 linkages in a random way. This glucan backbone may be substituted by *O*-acetyl and *O*-succinyl ester-linked residues.

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are general constituents of the envelopes of gram-negative bacteria (4). Glucose is the sole constitutive sugar, and their abundance in the periplasmic compartment is osmoregulated, with the highest levels synthesized during growth at very low osmolarity. Four families of OPGs have been described on the basis of structural features of the polyglucose backbone. In family I, OPGs appear to range from 5 to 12 glucose residues, with the principal species containing 8 or 9 glucose residues. The structure is highly branched, the backbone consisting of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages. In family II, OPGs are composed of a cyclic β -1,2-glucan backbone containing 17 to 25 glucose residues. In family III, OPGs are β -1,6 and β -1,3 cyclic glucans containing 10 to 13 glucose units per ring. In family IV, OPGs are cyclic and have a unique degree of polymerization (DP, = 13, 16, or 18). One linkage is α -1,6 whereas all the other glucose residues are linked by β -1,2 linkages. Depending on the species considered, OPGs can be modified to various extents by a variety of substituents. Mutations at the loci *ndvA* and *ndvB* in *Sinorhizobium meliloti* (8), *ndvB* and *ndvC* in *Bradyrhizobium japonicum* (3), *chvA* and *chvB* in *Agrobacterium tumefaciens* (17), and *hrpM* in *Pseudomonas syringae* (11, 13) impair OPG biosynthesis, and these mutants fail to interact properly with a host plant as a symbiont or a pathogen. However, beyond this functional homology, the OPGs synthesized by these different bacteria are very different in structure. The OPGs of *S. meliloti* and *A. tumefaciens* are cyclic structures of family II that may be modified with anionic substituents such as phosphoglycerol and/or succinyl moieties (5), the OPGs of *B. japonicum* are cyclic structures of family III that may be modified by substitution

with phosphocholine (18), while the OPGs of *P. syringae* are linear and highly branched and devoid of any substituents (24).

Except for substitution, the OPGs of *P. syringae* are very similar to the OPGs synthesized by the enterobacterium *Escherichia coli*, which colonizes animals. In this bacterium, OPGs are a heterogeneous family of oligosaccharides ranging from 5 to 12 glucose residues (9). The structure is highly branched and consists of a backbone of β -1,2-linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages. They may be substituted to various degrees with *sn*-1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and *O*-succinyl ester residues.

Erwinia chrysanthemi is a pathogenic enterobacterium responsible for the soft rot disease of a wide range of plants. The pathogenicity of the bacterium is due in part to its ability to produce extracellular enzymes, such as pectinases, cellulases, and proteases, which are able to degrade constituents of the plant cell wall (1, 19).

Recently, the *opgGH* operon of *E. chrysanthemi* was cloned and inactivated on the chromosome (15). The mutants, defective in OPG synthesis, exhibit a pleiotropic phenotype and a complete loss of virulence. In an attempt to understand the function of OPGs at the molecular level in the plant-bacterium interaction, we examined the structures of the OPGs synthesized by *E. chrysanthemi*. OPGs produced by *E. chrysanthemi* are heterogeneous in size and possess structures similar to those of *E. coli* and *P. syringae*. In addition, they may be substituted by *O*-acetyl and *O*-succinyl ester residues.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth. *E. chrysanthemi* 3937 was grown on a rotary shaker at 30°C in LOS (low osmolarity) medium [4 g of casein hydrolysate, 0.5 mg of FeSO_4 , 18 mg of MgCl_2 , 200 mg of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 175 mg of K_2HPO_4 per liter (pH 7.2)] supplemented with 2 mg of thiamine and 2 g of glycerol. The LOS medium osmolarity is 85 mosM. To obtain high-osmolarity medium, NaCl was added to LOS medium up to 0.3 M.

* Corresponding author. Mailing address: U.S.T.L., Bât. C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 33 (0)3 20 43 65 92. Fax: 33 (0)3 20 43 65 55. E-mail: jean-pierre.bohin@univ-lille.fr.

Cellular compartmentalization of OPGs. One hundred-milliliter cultures were harvested during the stationary phase of growth. After centrifugation at 4°C for 20 min at 4,000 × g, the supernatant was extracted with 50% ethanol, and cells from the pellet were gently resuspended at 4°C in 3 ml of 200 mM Tris-HCl (pH 8)–8.5% sucrose–10 µg of lysozyme per ml–20 mM EDTA and centrifuged at 4°C. Both the supernatant, containing the EDTA-released material, and the cell pellet, containing the retained fraction, were extracted with 50% ethanol. After concentration in a rotary evaporator, the extracts were fractionated by gel filtration on a Bio-Gel P-4 (Bio-Rad). The column (1.6 cm in cross section, 55 cm in height) was eluted at room temperature with 0.5% acetic acid at a flow rate of 15 ml/h, and fractions of 2.5 ml were collected. The oligosaccharides emerged in a peak of intermediate weight detected by the phenol-sulfuric acid procedure (6).

Large-scale isolation and purification of OPGs. Bacteria were collected during the exponential phase of growth by centrifugation at 4°C for 15 min at 8,000 × g. Cell pellets were extracted with 5% trichloroacetic acid (TCA), and the TCA extracts were neutralized with ammonium hydroxide and desalted on a Sephadex G-15 column. The desalted material was then fractionated by gel filtration on a Bio-Gel P-4 as described above. Fractions containing oligosaccharides were pooled and lyophilized.

Determination of neutral and anionic characteristics of OPGs. Glucans extracted as described above were desalted on a Bio-Gel P-2 column (Bio-Rad), lyophilized, and resuspended in 2 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer. OPG-containing fractions were pooled and chromatographed on a DEAE-Sephacel column (1.5 cm in cross section, 38 cm in height; Pharmacia) equilibrated with 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and eluted with the same buffer containing increasing concentrations of NaCl ranging from 0 to 0.2 M in steps of 0.05 M. A volume of 60 ml was used for each NaCl concentration, and the volume of each collected fraction was 4 ml.

Determination of succinate and acetate content from OPGs. OPGs were prepared as described above except that formic acid (0.5%) was used in place of acetic acid for Bio-Gel P-4 elution. OPGs were then desalted on Bio-Gel P-2 and separated by DEAE-Sephacel chromatography as described above. Fractions containing oligosaccharides were pooled, desalted, and lyophilized. One milligram of OPGs was dissolved in 0.2 ml of 0.5 M NaOH and incubated at 100°C for 30 min to liberate the succinyl and acetyl residues from OPGs. Glucosidic backbones were removed by absorption on 50 mg of charcoal suspended in 0.3 ml of water, and the charcoal was then washed three times with 0.5 ml of water. The four supernatants were pooled (2 ml) and neutralized with Dowex AG 50W-X8 (Bio-Rad) on H⁺ form. Succinic acid and acetic acid contents were determined with a succinic acid kit and an acetic acid kit, respectively (Boehringer Mannheim).

Deesterification of OPGs. OPGs were treated with 0.1 M KOH at 37°C for 1 h. After neutralization with AG 50W-X8 (Bio-Rad) on H⁺ form, the samples were desalted on a Bio-Gel P-2 column.

HPAEC-PAD. For high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), analysis and preparation of oligosaccharides were performed on a CarboPac PA-100 anion-exchange column (4 by 250 mm; Dionex, Sunnyvale, Calif.) equipped with a CarboPac PA guard column (3 by 25 mm; Dionex). Oligosaccharides were detected with a PAD II pulsed amperometric detector with a gold electrode (Dionex). The chromatographic data were integrated and plotted with an SP 4270 integrator (Spectra-Physic, San Jose, Calif.). Oligosaccharides were eluted at a flow rate of 1 ml/min by a two-step procedure consisting of (i) 0.05 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 5 min and (ii) a linear gradient of 0.05 to 0.2 M sodium acetate in 0.15 M NaOH for 35 min. After every run, the column was reequilibrated in 0.05 M NaOH for 15 min.

The oligosaccharides were prepared in the same way. Fractions were collected and separated on a Dowex AG 50W-X8 column on H⁺ form (5 by 1 cm; Bio-Rad) eluted with water. The acetic acid produced was neutralized by NH₄OH. Some Na⁺ was left, which was subsequently removed by desalting on a Bio-Gel P-2 column.

MALDI-MS. For matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI)-mass spectrometry (MS), experiments were carried out on a Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337-nm wavelength and 3-ns pulse width). After selection of the appropriate site on the target by a microscope, the laser light was focused onto the sample-matrix mixture at an angle of 15° and a power level of 10⁶ to 10⁷ W/cm². Positive ions were extracted by a 5- to 10-keV acceleration potential, focused by a lens, and the masses were separated by a Reflectron time-of-flight instrument. At the detector, ions were postaccelerated to 20 keV for maximum detection efficiency. The resulting signals were recorded with a fast transient digitizer with a maximum of 2.5 ns channel resolution and transferred to a

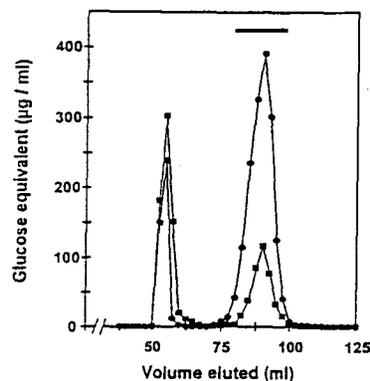


FIG. 1. Bio-Gel P-4 elution profile of OPGs of *E. chrysanthemi* grown in LOS medium (●) or in LOS medium supplemented with 0.3 M NaCl (■). The column (1.6 by 55 cm) was eluted with 0.5% acetic acid, and aliquots were analyzed for total carbohydrates (see Materials and Methods). Results are expressed as glucose equivalents per milliliter of eluant. In both cases, fractions indicated by the horizontal bar were lyophilized.

personal computer for accumulation, calibration, and storage. All MALDI mass spectra are the result of 20 single-shot accumulations.

The following matrices for carbohydrate analysis were used: 2,5-dihydroxybenzoic acid, (10 g/liter in water [22]) and 3-aminoquinoline (10 g/liter in water [23]). Lyophilized oligosaccharides samples were redissolved in double-distilled water and then diluted with an appropriate volume of the matrix solution (1:5, vol/vol), 1 µl of the resulting solution was deposited onto a stainless steel target, and the solvent was evaporated under a gentle stream of warm air.

Methylation analysis. The oligosaccharides were methylated according to Paz-Parente et al. (16). The methyl ethers were obtained after methanolysis (0.5 M methanol hydrochloride, 24 h, 80°C) and analyzed as partially methylated methyl glycosides by gas-liquid chromatography (GLC)-MS (7). GLC was performed using a Delsi apparatus with a capillary column (25 m by 0.2 mm) coated with DB-1 (0.5-µm film thickness), applying a temperature gradient of 110 to 240°C at 3°C/min and a helium pressure of 40 kPa. The mass spectra were recorded on a Nermag 10-10B mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France) using an electron energy of 70 eV and an ionizing current of 0.2 mA.

NMR spectroscopy. Prior to nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic analysis, the oligosaccharides were twice treated with ²H₂O at room temperature. After each exchange treatment, the materials were lyophilized. Finally, each sample was redissolved in 0.5 ml of ²H₂O (99.96 atom% ²H; Aldrich). The NMR experiments were performed on a Bruker AM-400 spectrometer controlled by an Aspect 3000 computer with an array processor and equipped with a 5-mm mixed ¹H-¹³C probe head at a temperature of 25°C. Chemical shifts (δ) were referenced to acetone, the internal standard. Two-dimensional homonuclear COSY (correlation spectroscopy) 90, relayed and double-relayed COSY experiments, and two-dimensional heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) were performed by using standard Bruker pulse programs.

Other methods. Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (12) with bovine serum albumin as the reference protein. Total carbohydrate concentrations were determined by the anthrone method of Spiro (22) with D-glucose as the standard. Sugar analysis was carried out by GLC of trimethylsilyl derivatives of methyl glycosides formed by methanolysis in 0.5 M HCl in methanol at 80°C for 24 h (14). Reducing sugars were measured by the same method after reduction of the oligosaccharides with NaBH₄.

RESULTS

Isolation and characterization of OPGs. OPGs were extracted from cells of *E. chrysanthemi* by previously described procedures which involved TCA extraction. Fractionation on a Bio-Gel P-4 column allowed the separation of two main sugar-containing compounds (Fig. 1). The compounds eluting in the void volume of the column were probably high-molecular-weight lipo- or exopolysaccharides, as previously observed

(24). The second peak represented the OPGs. When cells of *E. chrysanthemi* were grown in LOS medium supplemented with 0.3 M NaCl, the amount of cell-associated oligosaccharides was reduced (Fig. 1). With no addition of NaCl, the OPG content (micrograms of glucose per milligram of cell protein) was 76 ± 5 . With the addition of 0.3 M NaCl, the OPG content was 7 ± 3 . Thus, cells grown in a medium of low osmolarity synthesized approximately 10 times more OPGs than cells grown in the same medium with 0.3 M NaCl.

Gas chromatographic analysis of the two OPG preparations after methanolysis, re-*N*-acetylation, and trimethylsilylation reactions revealed that glucose was the only monosaccharide present, indicating the absence of contaminating lipo- or exopolysaccharide material. The same analysis was performed after reduction of the OPGs and showed in both cases an average of 6.7 glucose residues per glucitol unit in the reduced glucans, consistent with an average of 7.7 glucose units/mol of glucans. Moreover, this result indicates that the glucans of *E. chrysanthemi* are not cyclic.

Cellular compartmentalization of OPGs. Export of OPGs to the extracellular medium has been observed for members of the family *Rhizobiaceae*, and extracellular glucans may play a fundamental role in plant-bacterium interactions (3, 5). However, this export varies greatly among different species and strains and is dependent on growth stage and culture conditions. Thus, it was important to determine whether the OPGs produced by *E. chrysanthemi* can be recovered in the external medium, at least under certain circumstances. Actually, 75% of the OPGs were found in the growth medium from stationary-phase cultures at low osmolarity (see Materials and Methods). Of the remaining 25%, 80% were liberated by EDTA treatment, which is known to release periplasmic content. Similar results were obtained when cells were separated by filtration.

OPG substitution. Thin-layer chromatography analysis showed different patterns for native and KOH-treated OPGs (see Materials and Methods; data not shown). This was indicative of a substitution of OPGs by ester-linked residues (alkaline-sensitive substitution). Therefore, OPGs were analyzed by anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel). When the OPGs were extracted from cells grown at low osmolarity, practically no material was retained by the column (Fig. 2), but when the OPGs were extracted from cells grown at high osmolarity, 20% of the total amount was retained and subsequently eluted with low-ionic-strength buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM NaCl).

Succinyl esters were previously found to give an acidic character to OPGs synthesized by different bacterial species. A new substituent, acetyl ester, was recently found in association with succinyl ester in *Rhodobacter sphaeroides* OPGs (P. Talaga, V. Coge, J.-M. Wieruszski, et al., unpublished data). For these reasons, succinic and acetic acids liberated after alkaline treatment of OPGs were determined using commercial kits (see Materials and Methods). A total of 28.5 ± 5.1 μ g of succinic acid per mg of glucose was found in the anionic fraction of OPGs extracted from cells grown in the high-osmolarity medium, whereas the amount was under the limit of detection (2.1 μ g/mg of glucose) when cells were grown in the low-osmolarity medium. A constant amount (6.1 ± 1.9 μ g) of acetic acid per mg of glucose was found whatever the growth conditions or fraction of OPGs considered.

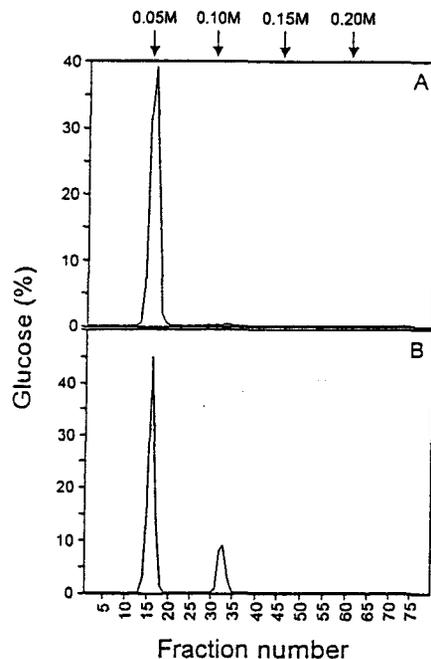


FIG. 2. DEAE-Sephacel anion-exchange column chromatography profiles of OPGs from *E. chrysanthemi* grown in LOS medium (A) or LOS medium with 0.3 M NaCl (B). Ionic strength was increased by steps of 0.05 M NaCl at the fractions indicated by the arrows. Fractions (4 ml) were collected, and total carbohydrate concentrations were determined by the anthrone method (see Materials and Methods). The amount of glucans in each fraction is expressed as a percentage of the total amount loaded on the column.

$^1\text{H-NMR}$ analysis. The OPGs of *E. chrysanthemi* grown in the high-osmolarity medium (Fig. 3) were analyzed by $^1\text{H-NMR}$ analysis. Peaks at 5.4 ppm are indicative of the H-1 of reducing glucose residues with the α -anomeric configuration. Peaks near 4.9 and 4.55 ppm are indicative of the H-1 of glucose residues engaged in β -1,2 and β -1,6 linkages, respectively. Those at 4.2 ppm were assigned to the H-6 of glucose residues linked by a β -1,6 linkage. The two triplets present between 2.4 and 2.8 ppm confirmed the presence of succinyl substituents.

Methylation analysis. OPGs extracted from cells grown at low or high osmolarity were first subjected to alkaline treat-

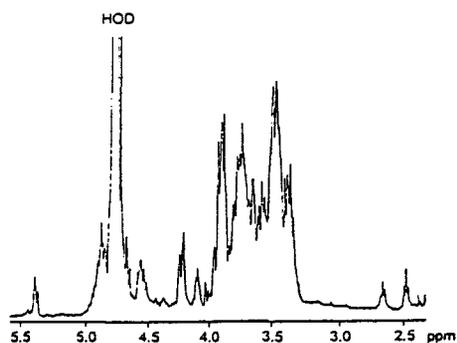


FIG. 3. $^1\text{H-NMR}$ analysis of OPGs of *E. chrysanthemi* grown in LOS with 0.3 M NaCl. NMR spectra were recorded as described in Materials and Methods.

TABLE 1. Methylation analysis of OPGs of *E. chrysanthemi*

Carbohydrate ^a	Relative amt detected ^b after growth in LOS medium with:	
	No NaCl	0.3 M NaCl
Terminal Glc (2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methylglucose)	1.1	1.2
2-Linked Glc (3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl Glc)	1.9	1.8
6-Linked Glc (2,3,4-tri- <i>O</i> -methylglucose)	0.2	0.2
2,6-Linked Glc (3,4-di- <i>O</i> -methylglucose)	1.0	1.0

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

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

ment to remove all succinic and acetic substituents. Then, the OPGs were methanolized and, after acetylation, subjected to GLC-MS analysis. In both cases, the results of the methylation analysis revealed the presence of 3,4-di-, 3,4,6-tri-, and 2,3,4,6-tetra-*O*-methylglucose (Table 1). This indicated that the glucans were branched structures, with branch points doubly substituted in positions 2 and 6. The ratio of 2-linked Glc to 2,6-linked Glc was approximately 2. This suggested that about two glucose residues were linked through positions 1 and 2 for every internal glucose residue linked through positions 1, 2, and 6. This indicated that the glucans were highly branched structures.

¹³C-NMR analysis. KOH-treated OPGs of *E. chrysanthemi* grown in low-osmolarity medium were analyzed by ¹³C-NMR analysis (Fig. 4A). This analysis revealed that the C-1 resonance peaks all clustered near 104 ppm. This shift is indicative of the β-glycosidic linkage. The peaks near 70 ppm are indicative of β-1,6 linkages and represent the resonances for both C-4 and C-6 (β-1,6) carbons. The C-6 assignment was confirmed by a nonselective polarization transfer technique, showing the characteristic CH₂ negative signal. The resonances near 83 ppm were assigned to C-2 in β-1,2 glycosidic linkages. Peaks near 62 ppm are indicative of C-6 carbons not involved in glycosidic linkages, while those at 74.5 ppm are indicative of C-2 carbons not involved in glycosidic linkages. The resonances near 77.5 ppm may be assigned to both C-5 and C-3

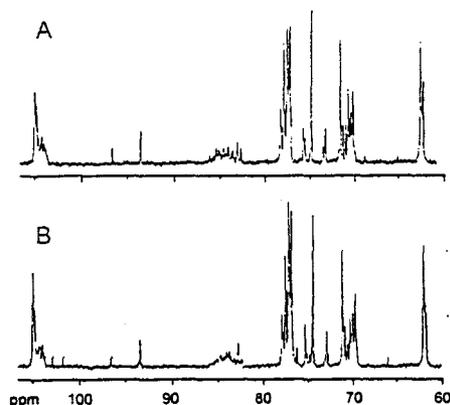


FIG. 4. ¹³C-NMR analysis of KOH-treated OPGs of *E. chrysanthemi* (A) and *P. syringae* (B) grown in LOS medium. NMR spectra were recorded as described in Materials and Methods.

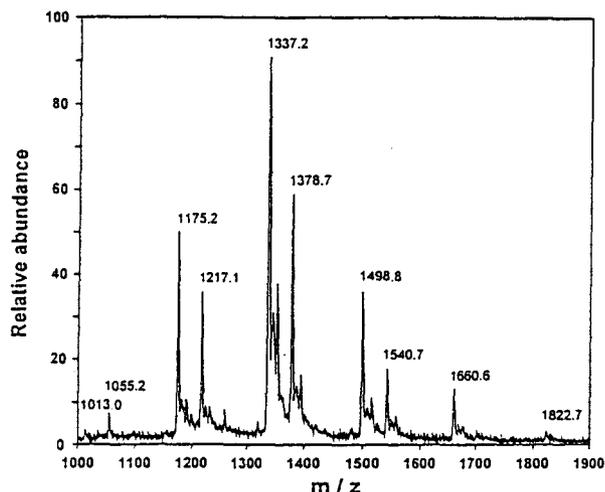


FIG. 5. Positive-ion MALDI mass spectra of OPGs of *E. chrysanthemi* grown in LOS medium without addition. Mass assignments are based on an external calibration.

carbons not involved in glycosidic linkages. The acyclic nature of the glucans was confirmed by the presence of resonances at 96 and 92.5 ppm, corresponding to the β and α anomeric carbons, respectively, of the reducing-glucose residues. Furthermore, the resonances at 72.7 ppm could be assigned to C-3 and C-5 of the α anomer of the reducing glucose, while the corresponding signals of the β anomer were part of the complex of signals at 75 ppm. All these assignments were confirmed by a ¹³C-decoupled, ¹H-detected HMQC analysis.

The ¹³C-NMR spectra of the OPGs of *E. chrysanthemi* and those of *P. syringae* are very similar (Fig. 4A and B). We can conclude that both glucans possess essentially the same structure: a backbone consisting of β-1,2-linked glucose units, to which branches, composed of one glucose residue, are attached by β-1,6 linkages.

MALDI-MS. Quasimolecular ions were obtained by the MALDI-MS method for the OPGs of *E. chrysanthemi* grown in LOS medium without NaCl. This analysis revealed the presence of six sodium-cationized molecular ions, [M + Na]⁺, at approximately *m/z* 1,013, 1,175, 1,337, 1,499, 1,661, and 1,823 (Fig. 5). These molecular ion species had masses identical to those expected for linear glucans composed of 6 to 11 glucose residues, with the principal species containing 8 glucose residues. Four sodium-cationized molecular ions, [M + Na]⁺, at approximately *m/z* 1,055, 1,217, 1,379, and 1,541, were detected and correspond to glucans of 6, 7, 8, and 9 degrees of polymerization, respectively, with a mass increment of 42, which is expected for an *O*-ester-linked acetyl residue (Fig. 5). Peaks corresponding to minor species with *m/z* decreased by 18 below the values of the main molecular ions were due to in-source loss of water occurring during ionization, a phenomenon frequently observed in MS of carbohydrates. Peaks corresponding to the [M + K]⁺ ions were also present, with *m/z* increased by 16 above the masses of the corresponding sodiated ions. This analysis confirmed that each species of OPGs can be substituted by one acetyl residue.

MALDI-MS analyses of KOH-treated OPGs extracted from

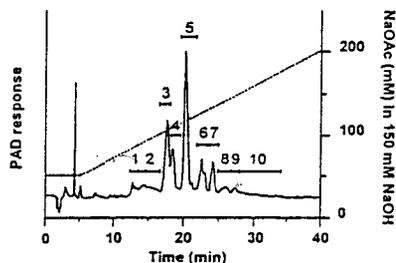


FIG. 6. HPAEC elution profile of KOH-treated OPGs of *E. chrysanthemi*. Oligosaccharide peaks were detected by PAD. The number above each peak indicates the fraction number. NaOAc, sodium acetate.

cells grown in the presence or absence of NaCl revealed identical spectra (data not shown).

HPAEC-PAD analysis. In HPAEC-PAD analysis of KOH-treated OPGs (Fig. 6), the number of peaks was greater than the number of carbohydrate-based signals determined by MALDI-MS. In order to understand this phenomenon, we performed HPAEC separation and subsequent MALDI-MS and methylation analyses of the predominant fractions. The MALDI-MS analysis (Table 2) revealed a molecular weight distribution slightly larger (5 to 12 glucose residues) than observed before separation (Fig. 5) and indicated that the retention volume increased as the degree of polymerization increased. Moreover, the presence of several isomeric oligomers was also revealed, as the component of fractions 3 and 4 containing 7 glucose units (Fig. 7A and B) and components of fractions 5 and 6 containing 8 glucose units are OPGs (Fig. 7C and D). The presence of minor signals in the spectra (Fig. 7) could result from some contamination of the neighboring peaks or from coelution with other compounds. Based on the MALDI-MS data, methylation analyses were performed on the components of fractions 3, 4, 5, and 6 (Table 3). These analyses clearly indicate that the OPGs of fraction 3 possess a higher number of β -1,6 branches than the OPGs of fraction 4 (Table 3). The same result was obtained for the OPGs of fractions 5 and 6 (Table 3). This clearly indicates that for a given isomeric OPG, the retention volume decreased when the number of β -1,6 branches increased.

Since $^1\text{H-NMR}$ analyses of OPGs from fractions 3, 4, 5, and 6 (data not shown) are as complex as the NMR analysis of the complete mixture, we can conclude that there is no repeat unit, such as alternating substituted and unsubstituted glucose units.

TABLE 2. HPAEC-PAD analysis of OPGs of *E. chrysanthemi*

Fraction no.	Retention time (min)	Measured mass(es) [M + Na] ⁺	No. of glucose residues
1	13	851	5
2	15	1,013	6
3	17.7	1,175	7
4	18.5	1,175	7
5	20.3	1,337	8
6	22.7	1,337	8
7	24.3	1,499	9
8	25.9	1,499, 1,662	9, 10
9	27.6	1,662	10
10	28–34	1,824, 1,986	11, 12

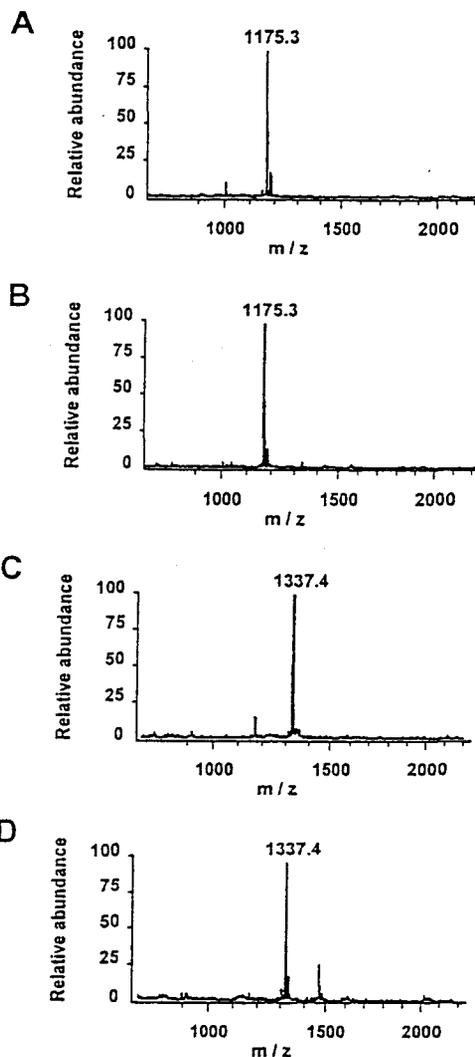


FIG. 7. Positive-ion MALDI mass spectra of OPGs of *E. chrysanthemi* HPAEC-PAD fractions 3 (A), 4 (B), 5 (C), and 6 (D).

The β -1,6 branches are situated randomly along the β -1,2 linear chains.

DISCUSSION

OPGs of *E. chrysanthemi* are found in larger amounts when the osmolarity of the growth medium decreases. The ratio observed (10-fold move in low osmolarity) is similar to those

TABLE 3. Methylation analysis of HPAEC fractions 3, 4, 5, and 6

Fraction no.	% Methylated sugar ^a (molar ratio)			
	Terminal Glc	2-Linked Glc	6-Linked Glc	2,6-Linked Glc
3	35 (2.4)	32 (2.2)	7 (0.5)	26 (1.9)
4	25 (1.8)	55 (3.8)	3 (0.2)	17 (1.2)
5	36 (2.9)	27 (2.2)	8 (0.6)	29 (2.3)
6	31 (2.5)	44 (3.5)	5 (0.4)	20 (1.6)

^a As methyl-*O*-acetylglucosides after methanolysis and peracetylation as described in Materials and Methods. The molar ratio is based on the degree of polymerization observed in the MALDI spectrum for each fraction.

already reported for *E. coli* and *P. syringae* (12, 14, 24). The structure determination of *E. chrysanthemi* OPGs showed that they are small glucans ranging in size from 5 to 12 glucose residues, made of a β -1,2-linked glucose backbone to which branches are attached by β -1,6 linkages. Thus, the OPG backbone structures synthesized by the two *Enterobacteriaceae* and the pseudomonad can be considered identical. One noticeable difference is at the level of cell concentration (about 30, 50, and 75 μ g of glucose per mg of cell protein for *E. coli*, *P. syringae*, and *E. chrysanthemi*, respectively). But the main differences reside in the number and variety of substituents, from the no-substituted OPGs of *P. syringae* to the highly substituted anionic OPGs of *E. coli*.

Further analyses by HPAEC-PAD revealed the high level of heterogeneity of these OPGs: a variable number of glucose residues are arranged with a variable number of branches whose position on the backbone is random. In no way can the OPGs of this family be described as repetitions of a conserved unit. This characteristic marks the demarcation between OPGs and other polysaccharidic structures found in bacteria.

Recently, the *E. chrysanthemi* genes involved in OPG biosynthesis (*opgGH*, accession number AJ294718) have been cloned. They exhibit a very high degree of similarity (86%) to their homologues *mdoGH* and *hrpM*, respectively, in *E. coli* and *P. syringae* (15). The fact that highly similar genes control the biosynthesis of OPGs belonging to the same structural family may seem obvious. However, the *Rhodobacter sphaeroides* *opgGH* genes (accession number AF016298) were recently isolated and characterized (A. Puskas, V. Coge, E. Gak, J.-P. Bohin, and S. Kaplan, unpublished data). They show a significant, although lower (55%), level of similarity to *mdoGH*, but they control the biosynthesis of OPGs belonging to family IV (Talaga et al., unpublished). Thus, structural analysis of OPGs will remain necessary even when gene sequences are known.

Moreover, this structural analysis revealed differences at the level of backbone substitution. *E. chrysanthemi* OPGs can be substituted by acetyl and succinyl residues, and the presence of succinyl depends on the growth conditions. Thus, while *P. syringae* OPGs are neutral and *E. coli* OPGs are highly anionic (10), *E. chrysanthemi* OPGs could have a mild anionic character when growth occurs at high osmolarity. The function of glucan substitution, which varies to a large extent from species to species, remains obscure. A highly attenuated *Salmonella enterica* mutant with a high immunogenic and protective potential in mice was found to have a transposon insertion in a gene similar to *mdoB* (25). In *E. coli*, the product of this gene is a membrane-bound P-glycerol transferase, which transfers residues from phospholipids to OPGs. Thus, this observation supports the conclusion that OPG substitution could play a role in bacterial virulence. *E. chrysanthemi* *opgG* and *opgH* mutants were recently obtained by cassette insertion into the chromosome (15). These mutants, which are defective in OPG synthesis, exhibit a pleiotropic phenotype and a complete loss of virulence (15). In an attempt to isolate mutants defective in OPG substitution, we screened several collections of Tn5 insertions in the strain 3937, as previously described for *E. coli* (10). However, despite several attempts, we were unable to obtain such mutants.

A large fraction of the OPGs synthesized by *E. chrysanthemi*

were recovered in the supernatant of centrifuged cultures when the cultures were collected in the stationary phase after growth at low osmolarity. However, it was not possible to determine the fraction of OPGs released (or secreted) during growth and the fraction released during the separation procedure. OPG detection in the medium is not possible without cell separation, and whatever the treatment, if one considers that outer membrane stability may be weakened under certain circumstances, shearing forces could release OPGs from the periplasmic space. No similar phenomenon was observed with *E. coli* cultures, but *E. chrysanthemi* envelope properties are clearly different, since, for example, OPG-defective mutants exhibit bile salt hypersensitivity, while similar mutants of *E. coli* have normal bile salt resistance (15). Similarly, strain T83 of *Erwinia amylovora* released a tightly complexed mixture of oligosaccharides and lipopolysaccharide in place of extracellular polysaccharide (20). The oligosaccharides, being branched structures with an average of 11 β -1,2- and β -1,6-linked glucose units, are most probably the OPGs produced by this particular strain. These observations open the questions of the actual organization of extracellular OPGs and of their role in pathogenesis. Membrane vesicles containing outer membrane protein, lipopolysaccharide, phospholipids, and periplasmic constituents are constantly extruded from the surface of a number of gram-negative bacteria (for a recent review, see Beveridge [2]). It was possible that OPGs released in the medium by *E. chrysanthemi* were included in such membrane vesicles. Nevertheless, we were unable to separate any fraction of the released OPGs when culture supernatants were further ultracentrifuged (100,000 \times g, 3 h; data not shown). Thus, released OPGs are probably in a soluble form.

Growth conditions in plant tissues are certainly very different from those in a liquid low-osmolarity medium on a rotary shaker. Thus, any extrapolation should be taken with caution. However, if OPGs are released during the infection of plants by *E. chrysanthemi*, they could play a fundamental role in pathogenesis. To test this possibility, potato tubers were inoculated with a mixture of Opg⁺ and Opg⁻ bacteria (15), and growth of the different bacteria was compared. *E. chrysanthemi* strains defective in OPG synthesis were unable to grow in planta, and growth could not be restored by the OPGs eventually provided by the neighboring wild-type bacteria. OPGs must be present in the periplasmic space of *E. chrysanthemi* to allow its growth in the plant host.

ACKNOWLEDGMENTS

V.C. and P.T. contributed equally to this work.

We thank Yves Leroy for the GLC-MS analyses, Bernd Stahl for recording part of the MALDI mass spectra, Anne Bohin for the culture of the phytopathogenic bacteria, and Jean-Marie Lacroix for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale and by the CNRS (UMR8576).

REFERENCES

1. Barras, F., F. Van Gijsegem, and A. K. Chatterjee. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:201-234.
2. Beveridge, T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membranes vesicles. *J. Bacteriol.* 181:4725-4733.
3. Bhagwat, A. A., A. Mitöfer, P. E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel, and D. L. Keister. 1999. Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis: an *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes

- cyclodecakis-(1→3)- β -glucosyl. *Plant Physiol.* 119:1057-1064.
4. Bohin, J.-P. 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria—a minireview. *FEMS Microbiol. Lett.* 186:11-19.
 5. Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58:145-161.
 6. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28:350-356.
 7. Fournet, B., G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil. 1981. Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides: application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* 116:489-502.
 8. Geremia, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares, and R. A. Ugalde. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β -(1,2) glucans. *J. Bacteriol.* 169:880-884.
 9. Kennedy, E. P. 1996. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) in *Escherichia coli*, p. 1064-1071. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 10. Lacroix, J.-M., E. Lanfroy, V. Copez, Y. Lequette, A. Bohin, and J.-P. Bohin. 1999. The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* 181:3626-3631.
 11. Loubens, L., G. Richter, D. Mills, and J.-P. Bohin. 1994. A pathogenicity gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* complements a defect in periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli* K12, p. 491-496. In M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph, and J. G. Swings (ed.), *Plant pathogenic bacteria*. INRA Press, Paris, France.
 12. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 13. Mills, D., and P. Mukhopadhyay. 1990. Organization of the *hrpM* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis, p. 47-57. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas*: biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 14. Montreuil, J., S. Bouquetel, H. Debray, B. Fournet, G. Spik, and G. Strecker. 1986. Glycoproteins, p. 143-204. In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate analysis: a practical approach*. IRL Press, Inc., Washington, D.C.
 15. Page, F., S. Altabe, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, J.-M. Lacroix, J. Robert-Baudouy, and J.-P. Bohin. 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* 183:0000-0000.
 16. Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet and G. Ricard. 1984. A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141:41-47.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Shevchik, V. E., and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 24:1285-1301.
 20. 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.
 21. Spiro, R. G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods Enzymol.* 8:3-27.
 22. Stahl, B., M. Steup, M. Karas, and F. Hillenkamp. 1991. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 63:1463-1466.
 23. Stahl, B., S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, and G. Sawatzki. 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 223: 218-226.
 24. Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin. 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 176:6538-6544.
 25. Valentine, P. J., B. P. Devore, and F. Heffron. 1998. Identification of three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect. Immun.* 66:3378-3383.

The *mdoC* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Membrane Protein That Is Required for Succinylation of Osmoregulated Periplasmic Glucans

JEAN-MARIE LACROIX, ERIC LANFROY, VIRGINIE COGEZ, YANNICK LEQUETTE,
ANNE BOHIN, AND JEAN-PIERRE BOHIN*

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR111 du CNRS, Université des Sciences et
Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

Received 24 February 1999/Accepted 19 April 1999

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) of *Escherichia coli* are anionic oligosaccharides that accumulate in the periplasmic space in response to low osmolarity of the medium. Their anionic character is provided by the substitution of the glucosidic backbone by phosphoglycerol originating from the membrane phospholipids and by succinyl residues from unknown origin. A phosphoglycerol-transferase-deficient *mdoB* mutant was subjected to Tn5 transposon mutagenesis, and putative mutant clones were screened for changes in the anionic character of OPGs by thin-layer chromatography. One mutant deficient in succinylation of OPGs was obtained, and the gene inactivated in this mutant was characterized and named *mdoC*. *mdoC*, which encodes a membrane-bound protein, is closely linked to the *mdoGH* operon necessary for the synthesis of the OPG backbone.

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are a family of oligosaccharides found in the periplasmic space of gram-negative bacteria. Their common features are the presence of glucose as the sole constituent sugar and their increased levels in low-osmolarity media.

Nevertheless, they are very different in structure. *Rhizobiaceae* and related bacteria synthesize cyclic or branched cyclic glucans, whereas *Enterobacteriaceae* and related bacteria synthesize branched linear glucans. These structural differences are correlated with genes implicated in the synthesis of the glucose backbone. These genes can be divided into two classes which have no homology. The first class is represented by the very similar genes of *Agrobacterium tumefaciens* (*chvA* and *chvB*) and *Sinorhizobium meliloti* (*ndvA* and *ndvB*) [7], while the second class contains the very similar genes of *Escherichia coli* (*mdoG* and *mdoH*) and *Pseudomonas syringae* (*orfI* and *hrpM*) [20].

These glucans may be substituted with various residues, depending on the species considered. Surprisingly, there is no correlation between the glucosidic structure of OPGs and the nature of substituents. Cyclic OPGs of *Brucella abortus* (7), *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* (28), and linear glucans of *P. syringae* (27) are devoid of substituents. OPGs of *Azospirillum brasilense* (cyclic glucans [1]) and *Erwinia chrysanthemi* (linear glucans [30]) are substituted only with succinyl residues, and cyclic OPGs of *Bradyrhizobium japonicum* are substituted only by phosphocholine (24). Cyclic glucans originating from *S. meliloti* and *A. tumefaciens* are substituted with both succinyl and phosphatidylglycerol residues (7), while cyclic OPGs of *Rhodobacter sphaeroides* are substituted with succinyl and acetate residues (29). OPGs originating from *E. coli* (linear glucans) are the only ones known to be substituted with three different substituents. These OPGs are substituted with phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine derived from membrane phospholipids and by succinyl residues of unknown origin (17).

In *E. coli*, the glucosidic backbones are synthesized by the products of the *mdoGH* operon. They appear to contain 6 to 12 glucose residues per mole, with the principal species containing 8 to 9 glucose units (17). MdoG is a periplasmic protein of unknown function (which is nevertheless required for synthesis of glucans [18]), while MdoH is a transmembrane β -1,2 glucosyl transferase acting on the cytoplasmic side of the inner membrane and is probably involved in the transfer of these glucans to the periplasmic space (10). The first characterized gene implicated in substitution was *mdoB* encoding the phosphoglycerol transferase I of *E. coli* (12, 16). This enzyme can transfer phosphoglycerol residues to an artificial acceptor, the β -glucoside arbutin. Since arbutin cannot enter the cytoplasm, the transfer should occur on the periplasmic face of the inner membrane. Thus, one can conclude that glucan backbones are substituted after their translocation to the periplasmic space (6). Similar conclusions were proposed for the substitution of cyclic glucans in *S. meliloti* (7). This transfer leads to the formation of diacylglycerol, which is toxic for cells and immediately phosphorylated by the diacylglycerol-kinase (encoded by the *dgk* gene) to yield phosphatidic acid.

When a *dgk* strain was grown in presence of arbutin, diacylglycerol formation was stimulated and its subsequent accumulation stopped the growth of the *dgk* strain. This was the basis of the selection of *mdoB* mutants in which phosphatidylglycerol turnover was slowed sufficiently to allow growth (16).

More recently, Breedveld et al. (8) isolated a mutant unable to transfer phosphoglycerol to OPGs in *S. meliloti*. They used a thin-layer chromatographic screening protocol because the genetic selection described above was inefficient in this bacterium (8a).

In this paper, we describe the isolation of a new gene required for the substitution of OPGs by succinate in an *E. coli* *mdoB* strain by using a similar thin-layer chromatographic screening protocol.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. The *E. coli* strains and phage used in this study are described in Table 1. Bacteria were grown at 37°C with vigorous shaking in Luria broth (LB) or in minimal medium 63 supplemented with the required metabolites and glucose as the carbon source (21). Solid media were obtained by

* Corresponding author. Mailing address: U.S.T.L., Bât. C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 33 (0)3 20 43 65 92. Fax: 33 (0)3 20 43 65 55. E-mail: Jean-Pierre.Bohin@univ-lille1.fr.

TABLE 1. Bacterial strains and phage used in this study

Strain or phage	Relevant genotype	Construction, source, or reference
Bacterial strains		
JM83	<i>ara</i> Δ (<i>lac-pro</i>) <i>thi rpsL</i> (ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15)	32
DF214	<i>his pgi::Mu</i> Δ (<i>zwf-edd</i>)1 <i>eda-1 rpsL</i>	D. Fraenkel via E. P. Kennedy
PT227	<i>F⁻ thr-1 leuB6</i> Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>hisG4 argE3 thi-1 ara-14 lacY1</i> <i>r galk2 xyl-5 mtl-1 mdoB214::Tn10 rpsL31 glnV44</i>	16
NFB732	JM83 <i>mdoB214::Tn10</i>	JM83 + P1 (PT227)
NFB734	DF214 <i>mdoB214::Tn10</i>	DF214 + P1 (PT227)
NFB1864	JM83 <i>mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5</i>	Tn5 mutant
NFB1897	JM83 <i>mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5</i>	NFB732 + P1 (NFB1864)
NFB1919	DF214 <i>mdoC1::Tn5</i>	NFB732 + P1 (NFB1864)
NFB1933	DF214 <i>mdoB214::Tn10 mdoC1::Tn5</i>	NFB734 + P1 (NFB1864)
Bacteriophage		
Phage λ NK467	<i>b221 rex::Tn5 c1857 Oam29 Pam80</i>	N. Kleckner via A. Pugsley

adding agar ($15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). When low-osmolarity medium was required, LB without NaCl or low-osmolarity medium was used (19).

Antibiotics in media were used at the following concentrations: ampicillin, $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; kanamycin, $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; tetracycline, $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. In addition, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) was used in media at a concentration of $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Transduction and transformation. Transduction with phage P1vir was carried out according to the method of Miller (21). *E. coli* cells were made competent and transformed by the calcium chloride technique (26).

Transposon mutagenesis. Random integration of Tn5 into the chromosome was obtained by using λ NK467 (Table 1) according to standard procedures (26).

Restriction enzymes, modification enzyme, and ligase. Restriction endonucleases (Eurogentec), the large (Klenow) fragment of DNA polymerase I, and ligase of T4 phage (Gibco BRL) were used according to manufacturer's recommendations.

Plasmid construction. For the sequencing of a fragment of the *mdoC* gene, a genomic DNA fragment of the *mdoC1::Tn5* strain NFB1897 was cloned in the *Bam*HI site of plasmid pUC8. This restriction enzyme cut once in the Tn5 DNA outside the gene, conferring kanamycin resistance to the transposon. Kanamycin-resistant clones harboring a plasmid containing a 16-kb DNA insert were isolated on plates containing kanamycin and ampicillin.

For the complementation tests, a 3-kb *Pst*I fragment containing *mdoC* originating from pNF239 (19) (see Fig. 3) was subcloned into the *Pst*I site of pBGS18 or pUC19 to yield pNF245 or pNF418, respectively.

For the sequencing of the *Ssp*I-*Pst*I fragment (0.4 kb) lying downstream from *mdoC*, pNF245 was cut by *Ssp*I (one site localized downstream from *mdoC*) and *Hind*III (one site derived from the polycloning site of pBGS18), and a 0.4-kb fragment was cloned into the *Sma*I and *Hind*III sites of M13mp18 and M13mp19.

For the translational fusion between the *lac* operon and the *mdoC* gene (*lacZ-mdoC*), pNF245 was cut by *Ssp*I and *Acl*II. A 1.4-kb DNA fragment containing the putative coding region of *mdoC* (see Fig. 3) was purified and cloned into pUC19 cut first by *Sal*I, filled in by using the Klenow fragment of DNA polymerase I, and then cut by *Xma*I to give pNF563. This plasmid was cut at the unique *Hind*III site (derived from the polycloning site of pUC19), filled in, and ligated in order to disrupt the reading frame of the fusion (pNF564).

DNA purification. Standard procedures (26) were used for genomic DNA extraction, large scale plasmid isolation, and rapid analysis of recombinant plasmids.

DNA sequencing. DNA sequences were determined with the Sequenase version 2.0 kit (US Biochemical Corporation) except for the Tn5 insertion point, where the oligonucleotide 5'-CATGGAAGTCAGATCCTGG-3' (Eurogentec), corresponding to the end of the two IS50 of Tn5, was used as a primer.

The DNA sequences and deduced amino acid sequences were analyzed by using computer programs made available from Infobiogen (15a).

Thin-layer chromatographic screening method. Each Tn5 mutant generated from NFB732 was screened as described by Breedveld et al. (8) and modified as follows: 4 ml of an overnight culture of *E. coli* grown in LB without NaCl was centrifuged and washed with 1 ml of water, and the pellet was resuspended in 250 μ l of 80% ethanol (vol/vol). The cell suspension was then heated for 30 min at 70°C and centrifuged for 10 min at $15,000 \times g$ at room temperature, and the supernatant (containing OPGs) was dried under a vacuum.

Dried supernatant was then resuspended in 15 μ l of water, and 5 μ l was spotted onto 0.2-mm-thick aluminum silica gel 60 plates (Merck). Oligosaccharides were separated in two runs, with an intermediate drying step, in an ethanol-butanol-water (5:5:4) solvent. Glucans were detected by spraying dried plates with 0.2% orcinol in 20% sulfuric acid followed by heating at 110°C for 10 min.

Extraction of OPGs. Cultures (200 ml) of *E. coli* were grown overnight in LB without NaCl. OPGs were extracted by the charcoal adsorption procedure (19). Pyridine extract obtained by this procedure was chromatographed on a Biogel P4

column (Bio-Rad). The column (1.5 by 68 cm) was equilibrated with 0.5% acetic acid and eluted at a rate of $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ in the same buffer. Fractions (2.5 ml) containing oligosaccharides were pooled, concentrated by rotary evaporation, and desalted on a Biogel P2 column (Bio-Rad), and fractions containing OPGs were pooled and lyophilized. Sugar content was determined colorimetrically by using the phenol-sulfuric acid reagent procedure (11).

Determination of succinate content from OPGs. One milligram of OPG was dissolved in 200 μ l of 0.5 M NaOH and incubated at 100°C for 30 min to liberate the succinyl residues from OPG. Glucosidic backbones were removed by absorption on 50 mg of charcoal, and the charcoal was then washed three times with 0.5 ml of water. The four supernatants (2.5 ml) were pooled, concentrated by rotary evaporation, and desalted on a minicolumn of Dowex AG 50 \times 8, 20- to 50-mesh (Bio-Rad) on H^+ form.

After lyophilization, samples were dissolved in 1 ml of water, and succinic acid content was determined with a succinic acid kit (Boehringer Mannheim).

Determination of neutral and anionic characteristics of OPGs. Strains were grown in low-osmolarity medium (5 ml) supplemented with 0.24 mM D-[U- ^{14}C] glucose ($125 \text{ MBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Glucans extracted as described above were desalted on a PD10 column (Pharmacia) equilibrated with a Tris-HCl 10 mM [pH 7.4] buffer. OPG-containing fractions were pooled and chromatographed on a DEAE-Sephacel column (1.5 by 38 cm; Pharmacia) equilibrated with 10 mM Tris-HCl [pH 7.4] and eluted with the same buffer containing concentrations of NaCl ranging from 0 to 0.2 M by steps of 0.05 M. A volume of 60 ml was used for each NaCl concentration, and the volume of each collected fraction was 4 ml.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of a mutant with altered phenotype of OPGs. A random Tn5 mutagenesis was performed in the *mdoB* strain NFB732 (deficient for the phosphoglycerol transferase I). In *mdoB* strains, OPGs lack phosphoglycerol substituents and succinyl residues are the only anionic substituents. Mild alkali treatment of OPGs removes selectively these succinyl residues. Glucans of NFB732 devoid of anionic substituents were substituted only with phosphoethanolamine residues and can be easily distinguished by a thin-layer chromatographic method (described in Materials and Methods). As expected, migration of glucans is greatly reduced after mild alkali treatment (Fig. 1, lane 3) compared to that of untreated glucans (Fig. 1, lane 1). Glucans extracted from 996 random Tn5 insertion mutants of NFB732 were analyzed by this chromatographic screening.

OPGs from clone 214, called NFB1864, showed the same reduced migration pattern with (Fig. 1, lane 4) or without alkali treatment (Fig. 1, lane 2), as seen with OPGs extracted from NFB732 and subjected to the mild alkali treatment (Fig. 1, lane 3).

Glucans from NFB1864 and NFB732 were subsequently analyzed for their succinyl content. Succinyl ester residues were hydrolyzed from glucans by alkali treatment, glucose backbones were removed, and succinic acid quantities were measured. No detectable succinate was found in the glucans extracted from NFB1864, while an average of 35 μg of succinyl



FIG. 1. Thin-layer chromatographic analysis of OPGs extracted from NFB732 (*mdoB*, lanes 1 and 2) or NFB1864 (*mdoB mdoC*, lanes 3 and 4). Extracts were applied directly to thin-layer chromatography plates (lanes 1 and 3) or first subjected to mild alkali treatment to remove succinyl substituents (lanes 2 and 4).

per mg of OPGs was found in glucans extracted from NFB732. On the other hand, the glucan amount per cell was shown to be identical in the two strains, indicating that the loss of succinyl residues was not the consequence of a reduction in the glucose backbone synthesis. Thus, this mutant synthesized glucans devoid of succinyl residues, and the gene interrupted by the Tn5 insertion was called *mdoC*.

The Tn5 insertion is responsible for the altered phenotype of OPGs. The Tn5 mutation from NFB1864 was transferred by P1 phage generalized transduction into strains DF214 and JM83 and their *mdoB* derivatives. After selection of transductants for kanamycin resistance, OPGs were extracted and subjected to the thin-layer chromatographic analysis. Strains containing both *mdoB* and *mdoC* mutations produced glucans with the same migration pattern as those of NFB1864, indicating that the Tn5 insertion was responsible for the altered phenotype of OPGs (data not shown).

OPGs isolated from the *mdoC* mutant are neutral. Specific labeling of OPGs was obtained by growing cells of strain DF214 (*pgi, zwf*) and its derivatives, NFB734 (*mdoB*), NFB1919 (*mdoC*), and NFB1933 (*mdoB, mdoC*), in the presence of radioactive glucose. They produced the same amount of OPGs when grown in a low-osmolarity medium and a similar reduction (six to seven times) was observed when the osmolarity was increased by the addition of 0.3 M NaCl. The anionic or neutral character of OPGs was confirmed by a DEAE-Sephacel chromatographic analysis of radiolabeled glucans. OPGs extracted from DF214 (*mdo*⁺, Fig. 2) were separated into five subfractions, named I to V (III, IV, and V correspond to A, B, and C, respectively, in Van Golde et al. [31]). Subfractions II to V were eluted at increasing concentrations of NaCl and correspond to anionic replaced glucans. Phosphoglycerol and phosphoethanolamine substitutions of each subfraction were previously analyzed by using radiolabeled precursors (22, 31). Phosphoglycerol and phosphoethanolamine were present in subfractions III to V, and low levels of phosphoethanolamine were detected in subfractions I and II, while phosphoglycerol was hardly detected in subfraction II. Subfractions III and IV were further characterized (31). Both were heterogeneous and contained succinyl ester substituents. At pH 7.4, the anionic character is conferred only by phosphoglycerol and

succinyl substituents. If OPGs were homogeneously sized, one could consider that subfraction II to V correspond to increasing negative charges (-1, -2, -3, and -4) attached to the glucosidic backbone. However, the OPG backbones are heterogeneous in size, with a degree of polymerization ranging from

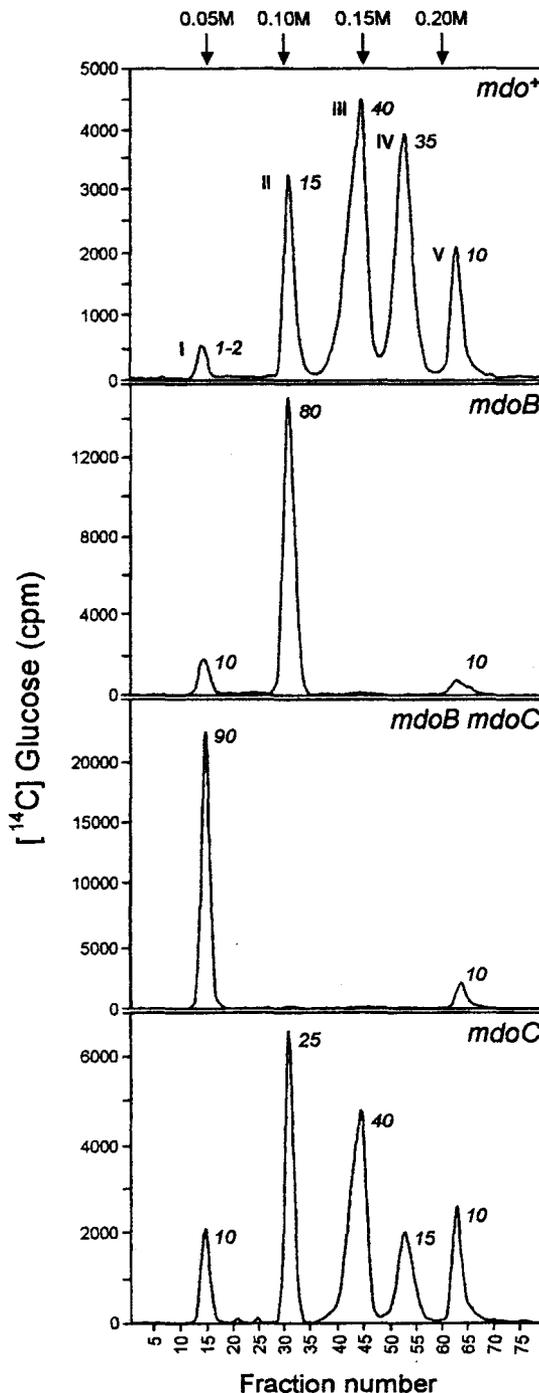


FIG. 2. DEAE-Sephacel anion exchange column chromatography profiles of [U-¹⁴C] glucose labeled OPGs from strains DF214 (*mdo*⁺), NFB734 (*mdoB*), NFB1933 (*mdoB mdoC*), and NFB1919 (*mdoC*). Ionic strength was increased by steps of 0.05 M NaCl at fractions indicated by the arrows. Fractions (4 ml) were collected and aliquots were counted. Peak I, neutral glucans; peaks II to V, anionic glucans. The number on the right of each peak refers to the percentage of the total for the corresponding subfraction.

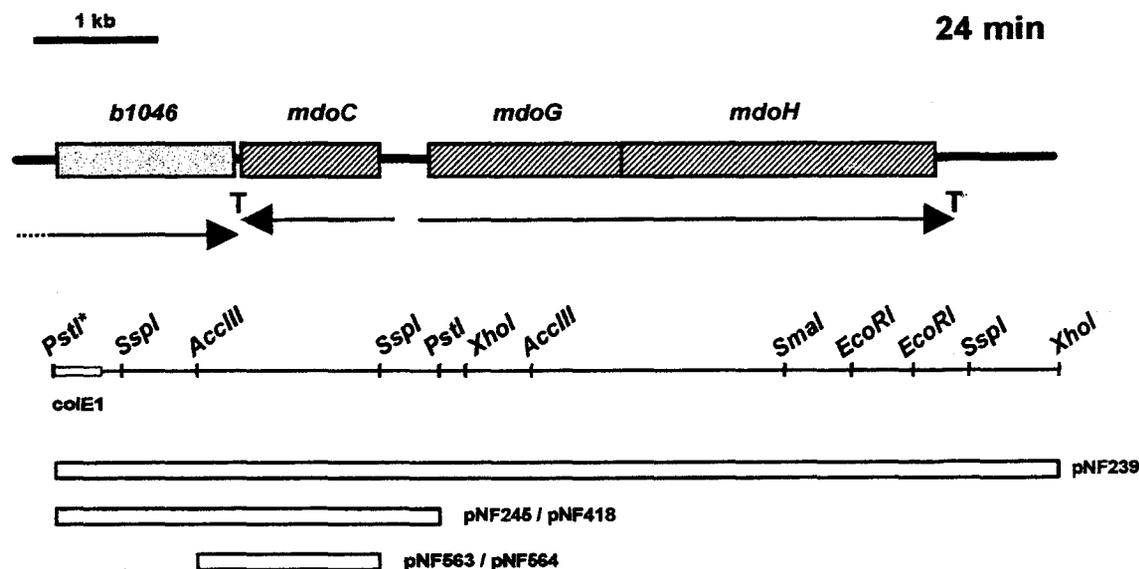


FIG. 3. Genetic organization of the *mdoC* region of the *E. coli* chromosome (top) and restriction map of the 8-kb insert of pNF239 and its derivatives (bottom). Only relevant restriction sites are shown; arrows and T indicate transcriptional units and transcriptional terminators, respectively. *PstI** and *colE1* are part of the insert originating from the *colE1* vector (9). Horizontal empty bars indicate the structure of the various inserts of the plasmids.

6 to 12. Thus, subfraction II to V should correspond to various charge-to-mass ratios due to various levels of substitution of heterogeneously sized backbones.

This interpretation was confirmed by the analysis of OPGs produced by various mutant strains. In OPGs extracted from NFB734 (*mdoB*; Fig. 2), subfraction II became prominent (80% of the total), subfractions III and IV disappeared, and subfraction I increased to 10%. In glucans extracted from NFB1933 (*mdoB mdoC*; Fig. 2), 90% of the OPGs were found in the neutral subfraction I. These results clearly indicated that *mdoC* is involved in the succinyl substitution of OPGs. In strain NFB1919 (*mdoC*; Fig. 2), subfraction II was increased while subfraction IV decreased. The simplest interpretation is that parts of the OPGs in the subfractions II, III, or IV change their charge-to-mass ratio since they are no longer succinylated in the *mdoC* strain, and are eluted with subfractions I, II, or III, respectively.

The increase in subfraction I of the *mdoB* and the *mdoC* strains indicates that part of the molecules are substituted by only one kind of anionic residue. This is consistent with the observation that about 50% of the subfraction III of the wild-type strain contains only phosphoglycerol substituents (17). However, since the increase observed in the mutant cells was lower than expected, one can conclude that a defect of one kind of substitution is compensated, at least partially, by increasing the level of the other.

In this context, the nature of the subfraction V remains obscure; the possibility exists that it contains non-OPG materials since low levels of labeled materials were observed by Sephadex G25 chromatography of extracts of a *mdoG* mutant (18).

Tn5 insertion lies within a gene adjacent to the *mdoGH* operon. The *mdoC1::Tn5* mutation was cloned into the pUC8 plasmid vector from the genomic DNA by selecting for the kanamycin resistance conferred by the transposon. The DNA sequence read from the resulting plasmid started within the IS50 DNA and continued in the *mdoC* DNA. Comparison of this sequence and the *E. coli* genomic DNA data (5, 23) allowed us to localize *mdoC* as the previously unassigned gene, named b1047, just upstream from the *mdoGH* operon (19).

The *mdoC* gene is entirely contained between two *PstI* sites in plasmid pNF239, which was previously said to contain the *mdoGH* operon (19). However, the comparison of the pNF239 restriction map with the sequence data now available revealed a large discrepancy of a set of restriction sites located upstream from *mdoG* (19). The *PstI* site present on the left of Fig. 3 does not appear to be of chromosomal origin. To elucidate the *PstI* origin, the 0.4-kb *PstI*-*SspI* (Fig. 3) fragment was cloned and sequenced; 75% of this sequence is from the *ColE1* vector used to obtain plasmid pLC25-18 (9) from which pNF239 was derived (19).

The localization of *mdoC* was confirmed by a complementation test with plasmid pNF418. This plasmid was constructed by subcloning the 3-kb *PstI* fragment from pNF239 (b1046 is inactivated in plasmid pNF418; Fig. 3). Thin-layer chromatography of OPGs from NFB1135 (pNF418/NFB1897) showed that they recovered their anionic character and therefore their succinyl substituents (data not shown).

Nucleotide sequence analysis of the *mdoC* gene. The Tn5 was found inserted at nucleotide 1107787 (5) (GenBank accession no. U00096). It is 377 nucleotides downstream from a putative start codon ATG (nucleotide 1108164). The corresponding open reading frame, encoding a 385-amino-acid polypeptide, ends at a TAA codon (nucleotide 1107007). Fifty-five nucleotides downstream from the TAA, two inverted repeats followed by a stretch of six Ts characteristic of an intrinsic transcription terminator are found.

The function of this open reading frame was confirmed as follows. A translational fusion *lacZ*-*mdoC* (pNF563) was obtained at the *SspI* site (Fig. 3) lying 27 nucleotides downstream from the first ATG of the open reading frame of *mdoC*. OPGs extracted from NFB1447 (pNF563/NFB1864) were analyzed on thin-layer chromatography and showed anionic character, indicating that this fusion was able to complement the mutation (data not shown). This fusion was disrupted by an insertion of 4 nucleotides at the *HindIII* site of the polylinker (pNF564). OPGs extracted from NFB1448 (pNF564/NFB1864) presented a neutral character, indicating that the *mdoC1::Tn5* mutation was not complemented by this plasmid.

Recent release of sequence data from *Salmonella typhi* (24a) revealed a strong conservation of the *mdoC* (82% identity), *mdoG* (94% identity), and *mdoH* (95% identity) coding sequences. The ATG of the *mdoGH* operon is separated from the putative ATG of the *mdoC* gene by 393 nucleotides in *E. coli* while in *S. typhi*, a deletion of 120 nucleotides reduces this region to 273 nucleotides. Nevertheless, this noncoding sequence is highly conserved (82% identity). A putative promoter is present in the conserved region: the -35 region is separated by 16 nucleotides from the -10 region located 170 nucleotides before the start codon. This putative *mdoC* promoter would be separated from the *mdoGH* promoter by only 102 nucleotides. Thus, the two operons may be coregulated since regulatory sites are generally found within 100 nucleotides upstream from the promoter (14).

Amino acid sequence analysis of MdoC. The MdoC protein (385 amino acids) exhibits stretches of hydrophobic amino acids over its entire length: 10 transmembrane segments are predicted by the TopPred2 program (26a, 33). The *exoH* gene, encoding a succinyl-transferase of 370 amino acids, is implicated in the synthesis of exopolysaccharides and is essential for the nodulation process of *Rhizobium meliloti*. ExoH, like MdoC, is essentially hydrophobic, and 7 or 11 transmembrane segments were proposed (3, 13). Nevertheless, no amino acid similarities between these two proteins were found.

The deduced amino acid sequence encoded by *mdoC* was compared to protein sequence data banks by using the BLAST2 software (2). Similarities were found with only one other bacterial protein, the product of *nolL*. *nolL* is a host-specificity gene encoding an acetyl-transferase protein of 373 amino acids implicated in the synthesis of the lipo-oligosaccharide Nod signal molecules (4) essential for the nodulation process of *Mesorhizobium loti* (25). The degree of similarity between MdoC and Noll, determined by using the LALIGN program (15), is 24.2% in 149 amino acid with no gaps in alignment except for three residues (two in MdoC and one in Noll). These similarities extended from amino acid 45 to 192 for MdoC and from residue 53 to 201 for Noll. The Noll protein, like ExoH and MdoC, is hydrophobic, and nine transmembrane segments are predicted. Thus, these three proteins are probably membrane associated. The origin of the succinyl residues remains unknown but one can postulate that they came from the succinyl-coenzyme A pool. It was clearly demonstrated that phosphoglycerol substituents, originating from the membrane phospholipids, are transferred on OPGs in the periplasmic space (6). Thus, one can suggest that the other substituents are also transferred in this cellular compartment. Then, the membrane-associated MdoC protein could catalyze the transfer of succinyl residues from the cytoplasmic side of the membrane to the nascent glucan backbones on the periplasmic side of the membrane.

In conclusion, closely linked to the operon encoding the two proteins necessary for OPG glucosidic backbone synthesis, *mdoC* is a gene encoding a membrane-spanning protein necessary for the substitution of these backbones. This gene organization could allow a common genetic control which remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

J.-M.L. and E.L. contributed equally to this work.

This research was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR111) and the Ministère de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie.

REFERENCES

- Altabe, S. G., P. Talaga, J.-M. Wieruszkeski, G. Lippens, R. Ugalde, and J.-P. Bohin. 1998. Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*, p. 390. In C.

- Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (ed.), Biological nitrogen fixation for the 21st century, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Becker, A., A. Kleickmann, W. Arnold, and A. Puhler. 1993. Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo- β -1,3-1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* 238:145-154.
- Berck, S., X. Perret, D. Quesada-Vincens, J.-C. Promé, W. J. Broughton, and S. Jabbouri. 1999. NolL of *Rhizobium* sp. strain NGR234 is required for O-acetyltransferase activity. *J. Bacteriol.* 181:957-964.
- Blattner, F. R., G. Plunket III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Bohin, J.-P., and E. P. Kennedy. 1984. Regulation of the synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. Assay of phosphoglycerol transferase I *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 259:8388-8393.
- Breedveld, M. W., and K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58:145-161.
- Breedveld, M. W., J. A. Hadley, and K. J. Miller. 1995. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 177:6346-6351.
- Breedveld, M. W., J. A. Hadley, and K. J. Miller. Personal communication.
- Clarke, L., and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *Escherichia coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- 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.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28:350-356.
- 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.
- Gluckman, M. A., T. L. Reuber, and G. C. Walker. 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 7045-7055.
- Gralla, G. D., and J. Collado-Vides. 1996. Organization and function of transcription regulatory elements, p. 1232-1245. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Huang, X., and W. Miller. 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12:337-357.
- Infobiogen Website. 5 February 1998, revision date. [Online.] <http://www.infobiogen.fr/>. [5 February 1998, last date accessed.]
- Jackson, B. J., J.-P. Bohin, and E. P. Kennedy. 1984. Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: characterization of *mdoB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* 160:976-981.
- Kennedy, E. P. 1996. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic beta-D-glucans) of *Escherichia coli*, p. 1064-1074. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lacroix, J.-M., I. Loubens, M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin. 1991. The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* 5:1745-1753.
- Lacroix, J.-M., M. Tempête, B. Menichi, and J.-P. Bohin. 1989. Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3:1173-1182.
- Loubens, L., L. Debarbieux, A. Bohin, J.-M. Lacroix, and J.-P. Bohin. 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling the pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 10:329-340.
- 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 Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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.
- Oshima, T., H. Aiba, T. Baba, K. Fujita, K. Hayashi, A. Honjo, K. Ikemoto, T. Inada, T. Itoh, M. Kajihara, K. Kanai, K. Kashimoto, S. Kimura, M. Kitawaga, K. Makino, S. Masuda, T. Miki, K. Mizobuchi, H. Mori, K.

- Motomura, Y. Nakamura, H. Nashimoto, Y. Nishio, N. Saito, T. Horiuchi, et al. 1996. A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28.0 min region on the linkage map. *DNA Res.* 3: 137-155.
24. 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. *Biochem. Biophys. Acta* 1116:215-225.
- 24a. Sanger Centre Website. 2 February 1998, revision date. Sequences. [Online.] http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi/. [2 February 1998, last date accessed.]
25. Scott, D. B., C. A. Young, J. M. Collins-Emerson, E. A. Terzaghi, E. S. Rockman, P. E. Lewis, and C. E. Pankhurst. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:187-197.
26. Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 26a. Stockholm University Theoretical Chemistry Protein Prediction Servers Website. 11 May 1997, revision date. Software. [Online.] <http://www.biokemi.su.se/server/toppred2/>. [17 April 1998, last date accessed.]
27. Talaga, P., B. Fournet, and J.-P. Bohin. 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 176:6538-6544.
28. Talaga, P., B. Stahl, J.-M. Wieruszkeski, F. Hillenkamp, S. Tsuyumu, G. Lippens, and J.-P. Bohin. 1996. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* 178:2263-2271.
29. Talaga, P., J.-M. Wieruszkeski, V. Coge, A. Bohin, G. Lippens, and J.-P. Bohin. Unpublished results.
30. Talaga, P., V. Coge, and J.-P. Bohin. Unpublished results.
31. Van Golde, L. M. G., H. Schulman, and E. P. Kennedy. 1973. Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1368-1372.
32. Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.
33. Von Heijne, G. 1992. Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225:487-494.

Titre : Relations entre structure et fonctions des glucanes périplasmiques osmorégulés chez les Protéobactéries

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des composants intrinsèques de l'enveloppe des Protéobactéries. *Rhodobacter sphaeroides* produit des OPG cycliques β -1,2 avec une liaison α -1,6 qui peuvent être substitués par des résidus de succinyle et d'acétyle. L'inactivation du gène *opgC* par insertion de transposon conduit à la production d'OPG neutres dépourvus de la substitution par les résidus de succinyle. En amont d'*opgC* et organisés en opéron avec celui-ci, trois gènes, *opgGIH*, ont été identifiés ; ces gènes sont nécessaires à la synthèse du squelette glucanique. Les protéines OpgG et OpgH présentent de fortes similitudes avec les produits des gènes qui gouvernent la synthèse des OPG linéaires branchés β -1,2, β -1,6 chez les Entérobactéries. L'expression hétérologue des gènes *opgIHC* chez *Escherichia coli* induit la synthèse de glucanes linéaires de plus grande taille et partiellement substitués par des résidus de succinyle. L'entérobactérie phytopathogène, *Erwinia chrysanthemi*, synthétise des OPG substitués par des résidus de succinyle et d'acétyle. Cette substitution dépend des conditions de culture. Les mutants déficients dans la synthèse des OPG présentent un phénotype pléiotrope (sécrétion réduite d'exo-enzymes, sensibilité aux sels biliaires, motilité réduite...) et ne sont plus virulents. Ces phénotypes ont permis d'isoler des pseudo-révertants. Les mutations additionnelles restaurent à divers degrés le comportement de la souche sauvage.

Mots clés : bactérie à Gram négatif, enveloppe bactérienne, glucane périplasmique osmorégulé, pathogénicité, succinyltransférase, glycosyltransférase, *Rhodobacter sphaeroides*, *Erwinia chrysanthemi*, phénotype pléiotrope.

Title : Relationship between structure and functions of Osmoregulated Periplasmic Glucans in Proteobacteria.

Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPGs) are intrinsic components of the envelope of Proteobacteria. *Rhodobacter sphaeroides* produce β -1,2, α -1,6 cyclic OPGs substituted by O-ester linked succinyl and acetyl residues. Transposon inactivation of the *opgC* gene resulted in production of neutral OPGs devoided of succinyl substitution. Upstream of, and forming an operon with *opgC* were found three genes, *opgGIH*, necessary to the glucose backbone synthesis. The OpgG and OpgH proteins share high level of similarity with the two proteins catalyzing the synthesis of β -1,2, β -1,6 linear branched glucans in Enterobacteriaceae. Expression of *opgIHC* in *Escherichia coli* resulted in the synthesis of longer linear glucans partially substituted with succinyl residues. The phytopathogenic Enterobacteria *Erwinia chrysanthemi* synthesizes OPGs substituted by O-ester linked succinyl and acetyl residues. This substitution depends on the growth condition. Mutants deficient in OPG synthesis exhibit a highly pleiotropic phenotype (exo-enzymes secretion, biliary salts sensitivity, motility...) and are not virulent. These phenotypes made possible the isolation of pseudo-revertants. The additional mutations restaured to various degrees the wild type behavior.

Keywords : Gram-negative bacteria, bacterial envelope, osmoregulated periplasmic glucan, pathogenicity, succinyltransferase, glycosyltransferase, *Rhodobacter sphaeroides*, *Erwinia chrysanthemi*, pleiotropic phenotype.

