

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

présentée par

Yannick LEQUETTE

pour l'obtention du grade de Docteur de l'université des Sciences et Technologies de Lille

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

**Biosynthèse des glucanes périplasmiques
osmorégulés chez *Escherichia coli* : analyse fonctionnelle
des protéines MdoG et MdoH et caractérisation de deux
nouvelles activités.**

Soutenue le 14 juin 2002, devant la commission d'examen :

Président :

Rapporteur :

Examineur :

Directeur de Thèse :

Dr Jean-claude Michalski

Dr Roberto Geremia

Dr Bernard Henrissat

Pr Michel Simonet

Pr Jean-Pierre Bohin

L'évidence est le privilège de la connaissance.

Remerciements.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576 CNRS/USTL de l'université des Sciences et Technologies de Lille dans l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes sous la direction du professeur Jean-Pierre Bohin.

Je remercie cordialement le Dr Roberto Geremia, le Dr Bernard Henrissat, le Dr Jean-Claude Michalski et le professeur Michel Simonet d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier le professeur J-P. Bohin de m'avoir accepté dans l'équipe de génétique des enveloppes bactériennes et soutenu afin de réaliser cette thèse.

Je remercie tout les membres de l'équipe : Jean-Marie Lacroix pour ces multiples conseils en particulier lors des expériences de génétique et de physiologie bactérienne. Anne Bohin qui m'a permis de m'intégrer rapidement dans l'équipe et qui est toujours présente pour aider ou régler les divers problèmes techniques, Virginie Cogez pour ces critiques constructives, Corinne Lambert et Carmen-Odberg pour avoir apporté des visions différentes en particulier dans le domaine de la biologie moléculaire et Laurival Villas Bôas et Claudine Begonki qui nous ont apporté leur bonne humeur exotique durant un an.

Je remercie aussi l'ensemble des personnes du bâtiment C9 qui m'ont aidé lors de ce travail. En particulier Jérôme Lemoine pour les interprétations des spectres de masse, Guy Ricard pour leur réalisation et Yves Leroy pour son aide dans l'interprétation de spectre de chromatographie en phase gaz.

Et je remercie tout particulièrement mes parents qui m'ont toujours laissé libre de mes choix, soutenu et continuent à me soutenir dans ces choix.

Introduction

A) L'enveloppe des Protéobactéries.....	2
I) La membrane cytoplasmique.....	2
1) Les phospholipides de la membrane cytoplasmique.	2
2) Les protéines de la membrane cytoplasmique.....	4
II) La membrane externe.	8
1) La bicouche lipidique.....	8
2) Les protéines de la membrane externe.....	10
III) Le périplasme.	15
1) Structure du périplasme.	15
2) Le sacculé de muréine.....	17
3) Les protéines du périplasme.	19
IV) Les Structures associées à la membrane externe.	20
1) Les Exopolysaccharides.	20
2) La couche S	21
3) Le flagelle.....	22
4) Les pili.....	23
B) Les glucanes périplasmiques osmorégulés.....	24
I) Structure des glucanes périplasmiques osmorégulés.....	27
1) Les OPG de la famille I.....	27
2) Les OPG de la famille II.	27
3) Les OPG de la famille III.	27
4) Les OPG de la famille IV.....	28
5) La substitution des OPG.....	28
II) Biosynthèse des OPG.	28
1) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille I	28
2) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille II.	32
3) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille III.....	32
4) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille IV.....	33
5) Les gènes impliqués dans la substitution des OPG.....	34
6) Phylogénie des gènes de biosynthèse des OPG.....	34
III) Régulation de la biosynthèse des OPG.	39
1) Régulation enzymatique.....	40
2) Régulation transcriptionnelle.....	40
3) Régulation par la concentration des OPG.	41
IV) Implication des OPG dans la physiologie cellulaire.	42
1) Phénotypes associés à l'altération des OPG.....	42

2) Interactions des OPG avec leur Environnement.	44
3) Hypothèses sur les Fonctions des OPG.	47
C) Les facteurs sigma alternatifs chez <i>E.coli</i>	48
I) Description des promoteurs.	50
1) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^{70}	50
2) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^S	50
3) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^E	51
4) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^H	51
II) Structure des facteurs sigma.	52
1) Structure du facteur σ^{70}	52
2) Structure du facteur σ^S	52
3) Structure du facteur σ^E	53
4) Structure du facteur σ^H	53
III) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^S	53
1) Rôles physiologiques du facteur σ^S	53
2) Régulation du facteur σ^S	56
IV) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^E	57
1) Rôles physiologiques du facteur σ^E	57
2) Régulation du facteur σ^E	58
V) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^H	59
1) Rôles physiologiques du facteur σ^H	59
2) Régulation du facteur σ^H	60

Partie I : Etude fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH

A) Etude de la topologie fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH.	65
I) Insertions d'un épitope dans les protéines MdoG et MdoH.	65
1) Insertions aléatoires d'un épitope EP31 <i>Bam</i> HI.	65
2) Insertion dirigée d'un épitope dans la seconde boucle périplasmique de la protéine MdoH.	69
3) Génération de l'allèle <i>mdoG215</i>	70
II) Influences des mutations sur l'activité des protéines MdoG et MdoH et sur la structure des OPG.	70
1) Analyses de l'activité de synthèse des protéines MdoG et MdoH.	70

2) Analyses structurales des OPG.	78
B) Influences de trois acides aspartiques conservés dans l'activité de la protéine MdoH.	81
I) Génération des mutations ponctuelles.	82
II) Analyse de l'activité de synthèse des trois protéines mutantes.	82

Partie 2 : Etude du gène *MDOD*, paralogue du gène *MDOG*.

A) Caractéristiques génomiques du gène <i>MDOD</i>	85
B) Influence de gène <i>MDOD</i> sur la structure des OPG.	88
I) Inactivation du gène <i>mdoD</i>	88
1) Clonage du gène <i>mdoD</i>	88
2) Insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol dans le gène <i>mdoD</i>	90
3) Insertion de l'allèle <i>mdoD217::cml</i> sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	90
II) La mutation <i>mdoD217::cml</i> augmente l'hétérogénéité des OPG.	91
1) Purification et dosage des OPG produits par la souche <i>mdoD217::cml</i>	91
2) Mesure du caractère anionique des OPG produits par la souche <i>mdoD217::cml</i>	93
3) Mesure de la taille du squelette glucosidique des OPG produits par la souche <i>mdoD217::cml</i>	94
4) Mesure du taux de branchement des OPG produit par la souche <i>mdoD217::cml</i>	94
III) Complémentation de la mutation <i>mdoD</i>	96
1) Complémentation de la mutation <i>mdoD217::cml</i>	98
2) Influence de l'ORF <i>b1423</i> sur la biosynthèse des OPG.	103
3) Complémentation de la mutation <i>mdoD217::cml</i> par le plasmide pNF599.	107
4) Complémentation de l'allèle <i>mdoD218::cml</i>	109
5) L'expression du gène <i>mdoD</i> dépend t-elle du promoteur de l'ORF <i>b1423</i> ?	114
C) Etude de la régulation du gène <i>MDOD</i>	116
I) Génération de fusions traductionnelles <i>mdoD-lacZ</i>	116
1) Clonage de la petite fusion <i>mdoD-lacZ</i> traductionnelle.	117
2) Clonage de la grande fusion <i>mdoD-lacZ</i> traductionnelle.	117
3) Insertions des fusions <i>mdoD-lacZ</i> sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	119
II) Expression du gène <i>mdoD</i> au cours de la courbe de croissance.	120
1) Activité spécifique de la grande fusion <i>mdoD-lacZ</i>	120

2) Activité spécifique de la petite fusion <i>mdoD-lacZ</i>	120
3) Activité spécifique des fusions dans un contexte <i>rpoS</i>	123
4) Influence des gènes <i>hns</i> et <i>himA</i> sur l'expression du gène <i>mdoD</i>	124
5) Etude structurale des OPG produits en phase exponentielle.....	126
6) Activité spécifique de biosynthèse <i>in vivo</i> des OPG dans une souche <i>mdoD</i>	129
III) Régulation osmotique du gène <i>mdoD</i>	130
1) Activité spécifique de la grande fusion <i>mdoD-lacZ</i>	130
2) Activité spécifique de la petite fusion <i>mdoD-lacZ</i>	132
IV) Expression du gène <i>mdoD</i> face aux conditions de stress.	132
1) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors d'un stress hyperoxydatif.	133
2) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors d'un stress hyper osmotique	135
3) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors de la privation de source de carbone.	135

Partie 3 : Identification du gène impliqué dans l'activité phosphoglycérol-transférase II périplasmique.

A) Topologie et localisation de la protéine MdoB.....	139
I) Topologie de la protéine MdoB dans la membrane cytoplasmique.	139
II) Localisation de protéine MdoB.....	139
B) Mesure de l'activité phosphoglycérol-transférase II.	140
I) Purification de la phosphoglycérol-transférase II.....	140
II) Mesure de l'activité de la phosphoglycérol-transférase II <i>in vitro</i>	140
III) Substitution des OPG par le phosphoglycérol <i>in vivo</i>	142

Discussion

A) Biosynthèse du squelette glucosidique.	145
I) Mécanisme d'action de la protéine MdoH.....	145
1) Biosynthèse de la chaîne linéaire.	145
2) Implication de la protéine MdoH dans la translocation des OPG.....	150
3) Influences des boucles périplasmiques.....	152
II) rôle de la protéine MdoG : Hypothèses.....	152
III) Quel rôle pour la protéine MdoD ?.....	154

1) Influence de l'inactivation du gène <i>mdoD</i> sur la biosynthèse des OPG.....	154
2) Eléments de régulation du gène <i>mdoD</i>	155
IV) Apport de la phylogénie dans la compréhension de la biosynthèse des OPG.	157
B) Biosynthèse des OPG chez <i>E. coli</i>	159
I) Mécanismes de biosynthèse des OPG.	159
II) Eléments de régulation des gènes <i>mdo</i> chez <i>E. coli</i>	160

Matériels et Méthodes

A) Souches et milieux de culture.	165
I) Génotypes des souches et plasmides utilisés.	165
II) Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries.	169
B) Techniques Génétiques.....	169
I) Transduction.	169
II) Conjugaison.	170
III) Transformation.	170
IV) Recombinaison sur chromosome.	170
V) Mutagenèse par insertion aléatoire de transposon.	170
1) Production des phages λ TnlacZ/in et λ TnphoA/in.....	170
2) Insertions aléatoires de l'IS50 gauche.	171
3) Production d'ADN simple brin.	171
C) Techniques de biologie moléculaire.	172
I) Extraction et purification d'ADN.	172
II) Enzymes de restriction et de modification	172
III) Electrophorèse	173
IV) Mutagenèse dirigée.	173
1) Phosphorylation des Oligonucléotides.	173
2) Hybridation et synthèse du brin complémentaire.	173
3) Obtention des clones mutants	173
V) Séquençage nucléotidique.	174
D) Techniques Biochimiques.....	174
I) Marquage radioactif des OPG.	174
II) Extraction des OPG.....	175
1) Extraction des OPG radio-marqués.	175

2) Extraction des OPG en grande quantité.	175
III) Analyses structurales des OPG.	176
1) Analyse du caractère anionique des OPG.	176
2) Analyse structurale du squelette glucosidique.....	176
IV) Extraction des protéines périplasmiques.....	177
V) Dosage des protéines.....	177
VI) Dosage des activités enzymatiques.	177
1) Dosage de l'activité phosphoglycérol-transférase II.	177
2) Dosage de l'activité β -galactosidase.	178

Bibliographie	179
---------------------	-----

Introduction

Les réactions enzymatiques nécessitent une concentration minimale de l'enzyme et de son substrat pour interagir. *In vitro*, le tube à essai permet de confiner le substrat et l'enzyme dans un environnement suffisamment proche pour permettre l'accessibilité du substrat par l'enzyme. *In vivo*, une barrière lipidique permet de réaliser ce confinement. Initialement, cette barrière lipidique était formée d'une bicouche de lipides amphipatiques. Ce confinement a permis d'optimiser les réactions enzymatiques et favoriser les enzymes les plus efficaces. Mais une barrière formée uniquement de lipides ne permet pas le passage des molécules hydrosolubles. Cette barrière lipidique s'est fortement compliquée pour aboutir à une structure complexe renfermant trois des quatre composés biochimiques majeurs d'une cellule qui sont les lipides, les glucides et les protéines. Elle s'est dotée de systèmes de transport spécifique, de systèmes de sécrétion, de systèmes permettant de percevoir les conditions physico-chimiques du milieu extérieur et d'assurer les rôles de protection et de communication avec le milieu extérieur. Cette barrière est douée de fluidité et dotée d'une perméabilité sélective aux molécules hydrosolubles.

Les cellules eucaryotes et bactériennes sont dotées de cette barrière qui possède des caractéristiques communes mais aussi de grandes différences.

L'enveloppe des Protéobactéries est un exemple de cette barrière qui permet de délimiter le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Cette enveloppe bactérienne est constituée d'une membrane externe et d'une membrane cytoplasmique qui sont séparées par un compartiment intermédiaire périplasmique. L'enveloppe renferme un ensemble de systèmes de transport de composés divers, de systèmes de sécrétion, de systèmes permettant la perception des conditions physico-chimiques du milieu externe, la transduction des signaux. L'ensemble de ces systèmes est gouverné par le génome bactérien dont l'expression est régulée par la perception des conditions extérieures et provoque une réponse adéquate par l'activation spécifique de gènes engendrant, entre autre, des changements au niveau de la structure et de la composition de l'enveloppe.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont intégrés dans la réponse des bactéries face aux conditions physico-chimiques du milieu extérieur. Les gènes de biosynthèse des OPG et leur régulation chez *Escherichia coli* ont fait l'objet de cette étude.

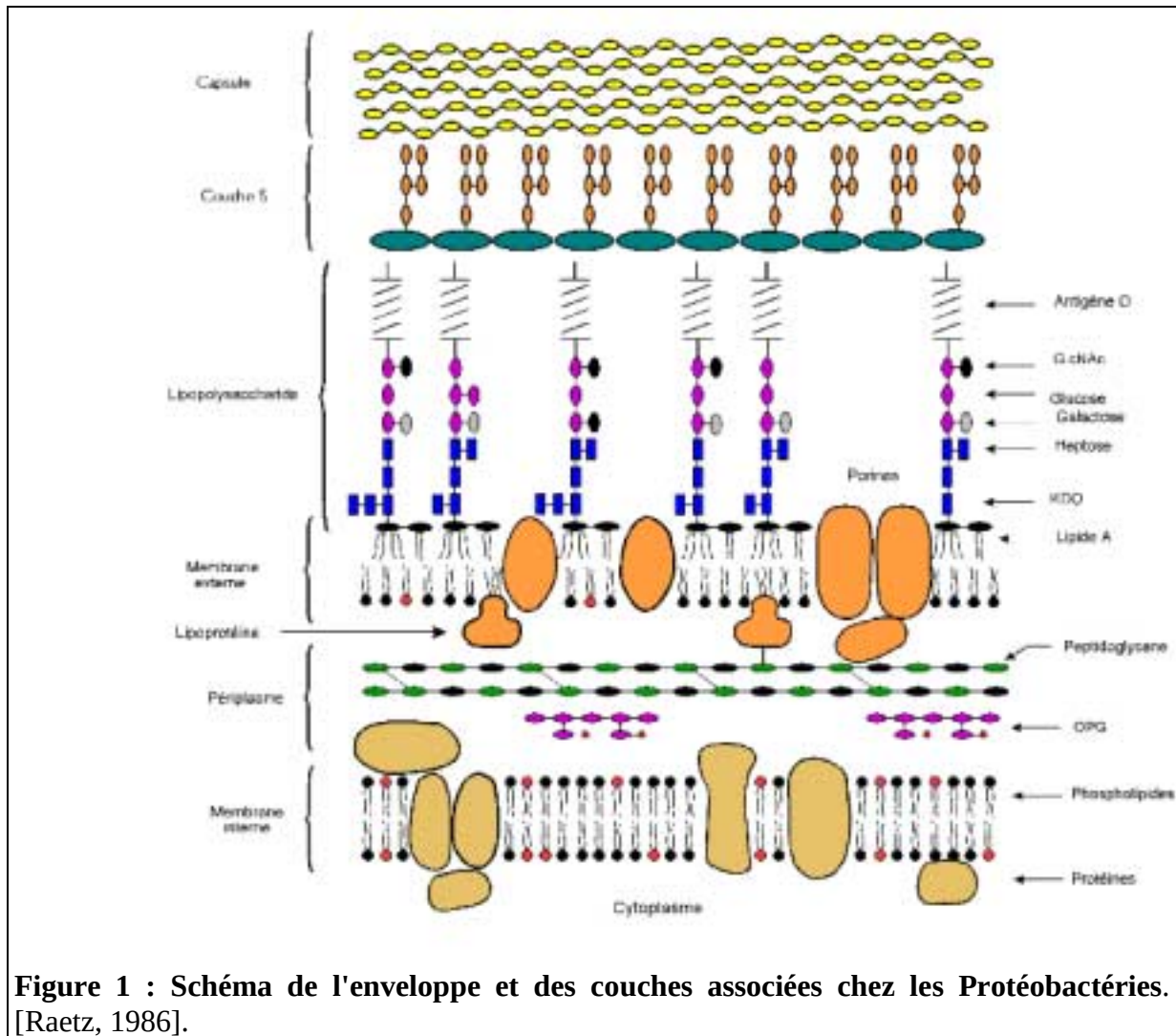


Figure 1 : Schéma de l'enveloppe et des couches associées chez les Protéobactéries.
[Raetz, 1986].

A) L'enveloppe des Protéobactéries.

Les données proviennent en majeure partie des études effectuées sur l'enveloppe de la bactérie *Escherichia coli* (figure 1).

I) La membrane cytoplasmique.

La membrane cytoplasmique est constituée grossièrement de 50% de lipides et 50% de protéines. Les lipides de la membrane cytoplasmique sont formés essentiellement de phospholipides qui représente 65 à 75% des lipides totaux de la cellule. [Kadner, 1996]

1) Les phospholipides de la membrane cytoplasmique.

La membrane cytoplasmique est organisée en une bicouche phospholipidique. Trois espèces majeures de phospholipides sont présentes chez les bactéries. Ce sont le

phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le cardiolipide dont les proportions sont respectivement : 70 à 80%, 15 à 25% et 5 à 10%. La proportion de chaque type de phospholipide peut varier suivant l'état physiologique de la bactérie. Ainsi le phosphatidylglycérol est plus abondant en phase exponentielle, tandis que la proportion du cardiolipide augmente en phase stationnaire [Vanden Boom et coll., 1989]. D'autres lipides à l'état de trace ont été caractérisés tels que l'acide phosphatidique, la phosphatidylsérine, le lysophospholipide et le diacylglycérol qui sont des intermédiaires de biosynthèse des phospholipides majeurs [Kadner, 1996]. Les phospholipides possèdent une structure commune formée d'une queue hydrophobe constituée de deux acides gras liés de manière covalente en position 1 et 2 à un résidu de glycérol donnant le diacylglycérol et d'une tête polaire constituée d'un résidu de phosphoéthanolamine ou de phosphoglycérol, liée par le résidu de phosphate sur le glycérol du diacylglycérol en position 3. Les acides gras les plus représentés sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide myristique (14:0) (acide gras saturé) puis l'acide palmitoléique (cis- $\Delta^{9,10}$ -16:0) et l'acide cis-vaccénique (cis- $\Delta^{11,12}$)-18:1 (acides gras insaturés).

Les trois phospholipides majeurs sont synthétisés à partir d'un précurseur commun l'acide phosphatidique [Cronan et coll., 1996]. L'acide phosphatidique provient de l'association du glycérol-3-phosphate et de deux molécules d'acides gras grâce aux enzymes codées par les gènes *plsB* et *plsC*. Les molécules d'acides gras destinées à la synthèse de l'acide phosphatidique sont apportées sous forme de résidus Acyl-ACP. L'ACP (Acyl Carried Protein) est une protéine constituée de l'association covalente d'une partie protéique de 25 kda (l'apoprotéine) et de la phosphopantéthéine (groupement prosthétique). L'acide phosphatidique est converti en CDP-glycéride par la protéine codée par le gène *cdsA*. L'association d'une sérine avec le CDP-glycéride (*pssA*) [Raetz et coll., 1974] donne le phosphatidylsérine qui subit rapidement une décarboxylation par l'enzyme codée par le gène *psd* pour donner le phosphatidyléthanolamine [Hawrot et coll., 1976].

Le phosphatidylglycérol résulte de la déphosphorylation (*pgpA*, *pgpB*) [Icho et coll., 1983] du phosphatidylglycérol phosphate [Chang et coll., 1967] ; lui-même provenant de l'association du CDP-glycéride et du glycérol-3-phosphate (*pgsA*) [Gopalakrishnan et coll., 1986]. Le cardiolipide est formé par l'association de deux molécules de phosphatidylglycérol (*cls*) [Pluschke et coll., 1978] avec la libération d'une molécule de glycérol.

La composition en phospholipides de la membrane cytoplasmique influence de nombreux systèmes : elle intervient dans l'efficacité du système de translocation des protéines

à travers la membrane cytoplasmique, dans la réplication du chromosome, dans la résistance aux antibiotiques, dans la motilité, *etc.* Les phospholipides sont aussi les précurseurs de nombreuses molécules situées dans le périplasme tels que les OPG (fournissant le phosphoglycérol ou la phosphoéthanolamine), la lipoprotéine de Braun (fournissant le diacylglycérol) ou de la membrane externe tel que les LPS (fournissant l'acide myristique et la phosphoéthanolamine).

La variation de la composition générale ou localisée permet de faire varier la fluidité de la membrane suivant l'environnement (température, présence d'ions, osmolarité...) et le besoin des systèmes enzymatiques insérés dans la membrane [Kadner, 1996] [Rietveld et coll., 1993] [Cronan et coll., 1996].

2) Les protéines de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique renferme un grand nombre de complexes protéiques impliqués dans les fonctions essentielles pour le développement des bactéries tels que le transport de solutés, la sécrétion des protéines, l'insertion des protéines membranaires, la production d'énergie, la transduction des signaux, *etc.*

a) La production d'énergie.

La principale fonction de la chaîne de respiration est de générer un gradient de proton de part et d'autre de la membrane cytoplasmique qui forme une barrière pour les protons. La membrane cytoplasmique possède par voie de conséquence la majeure partie des protéines impliquées dans ce métabolisme insérées ou associées sur l'une de ses faces. Deux pompes à protons ont été identifiées chez *E. coli* : Le cytochrome bo_3 ubiquinol oxydase (*cyoABCD*) [Minagawa et coll., 1990] et la NADH : ubiquinone oxidoreductase (*nuoA*) [Weiner et coll., 1993]. Ces deux pompes excluent les protons cytoplasmiques vers le périplasme. Les protons exclus dans le périplasme reviennent dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la F_0F_1 -ATP synthétase qui utilise ce gradient pour fabriquer des molécules d'ATP à partir de l'ADP et du P_i .

b) Les systèmes de transport de solutés.

Les systèmes de transport peuvent être divisés en quatre grandes catégories : les transporteurs n'utilisant pas d'énergie, les systèmes faisant intervenir le gradient de force motrice, les systèmes de transport utilisant l'énergie dérivée du phosphoénolpyruvate comme source d'énergie et les systèmes de transport faisant intervenir directement l'énergie

d'un nucléotide comme l'ATP.

Les transporteurs n'utilisant pas d'énergie sont dits uniport. Le soluté traverse la membrane grâce au gradient de concentration de ce même soluté, c'est le cas du transport du glycérol dont le canal est formé par la protéine GlpF ou encore de la protéine FocA [Maloney et coll., 1996] qui permet l'entrée du formiate.

Les transporteurs à symport et à antiport font intervenir les gradients ioniques. Le gradient d'ions H^+ est généré par la chaîne respiratoire qui rejette des protons dans le périplasma et provoque une différence de potentiel entre la face périplasmique et la face cytoplasmique de la membrane interne. Dans les transporteurs à antiport, l'énergie donnée par l'entrée des ions H^+ dans le cytoplasme permet par exemple la sortie de molécules toxiques hydrophobes (éthidium, thiolactomycine) par l'intermédiaire du transporteur EmrB. Pour les transporteurs à symport, l'entrée concomitante des ions H^+ permet l'entrée de soluté comme le lactose (LacY). L'entrée de l'ion Na^+ peut aussi servir de couplage à l'entrée de soluté comme le mélibiose (MelB) [Botfield et coll., 1992].

Les systèmes utilisant le phosphoénolpyruvate sont appelés systèmes PTS (Phosphoénolpyruvate (PEP) : carbohydrate PhosphoTransferase Systems). Ces systèmes font intervenir des protéines cytoplasmiques (EI, HPr) qui permettent d'apporter l'énergie du PEP par l'intermédiaire de la liaison énergétique pyrophosphoryle vers le transporteur spécifique situé dans la membrane cytoplasmique (EII). L'organisation des domaines de la protéine EII varie d'un système à l'autre. Pour l'entrée du glucose, la protéine EIIBC_{glc} forme un canal dans la membrane cytoplasmique, et la protéine EIIA_{glc} phosphorylée par HPr apporte le résidu phosphoryle à la protéine EIIBC_{glc} pour permettre l'entrée du glucose. Pour le mannose, la protéine cytoplasmique EIIB, phosphorylée par la protéine HPr, apporte le résidu phosphoryle au transporteur EII formé de deux domaines D et C [Postma, 1996].

La quatrième catégorie est représentée par le système de transport BDP ABC (ATP Binding Cassette). Ces systèmes possèdent une protéine périplasmique spécifique du substrat (BDP), une protéine cytoplasmique, reconnaissant l'ATP, fournissant l'énergie pour l'entrée du soluté (ATPase) et un transporteur formé de une à deux protéines membranaires qui permettent la translocation du soluté vers le cytoplasme. Les protéines MalG et MalF [Benz et coll., 1992] et NikA et NikB [Wu et coll., 1991] forment les perméases insérées dans la membrane cytoplasmique permettant respectivement l'entrée du maltose et du nickel.

c) Transport des protéines.

Deux types de protéines sont transportés hors du cytoplasme : Les protéines sécrétées

destinées au périplasma, à la membrane externe ou au milieu externe et les protéines insérées dans la membrane cytoplasmique. Ces deux types de protéines partagent des éléments des systèmes de sécrétion des protéines mais possèdent aussi des protéines spécifiques impliquées dans leur localisation.

Les protéines sécrétées peuvent être exportées par plusieurs systèmes. Dans le système de sécrétion de type I, les protéines sont sécrétées en une seule étape vers le milieu externe. Le signal de sécrétion est localisé dans la partie C-terminale de la protéine sécrétée. L' α -hémolysine d'*E. coli* est une protéine sécrétée par le système de type I grâce à l'ATPase (HlyB) et à la protéine de fusion (HlyD) insérée toutes deux dans la membrane cytoplasmique. Ce système fait partie de la famille des transporteurs ABC. Une protéine de la membrane externe (TolC) est aussi indispensable lors de la sécrétion vers le milieu extérieur. Les systèmes de sécrétion de types II, IV et V partagent le système Sec qui permet le passage des protéines à travers la membrane cytoplasmique vers le périplasma. Les protéines SecAYEG et SecB sont impliquées dans cette translocation. Le signal de sécrétion est localisé dans le N-terminal des protéines et reconnu probablement par la protéine SecA. La protéine SecB reconnaît la protéine SecA et permet d'amener les protéines vers le translocon SecAYEG. Chez *E. coli*, un locus possédant de forte homologie avec les gènes de type *gsp* (General secretory pathway) a été identifié, mais sa fonctionnalité n'a pas été démontrée. Par contre, la sécrétion des pectinases d'*Erwinia chrysanthemi* dépend d'un système de sécrétion de type II (Out) contenant 14 protéines localisées en majorité dans la membrane cytoplasmique. Le système de type IV est rencontré chez de nombreuses bactéries pathogènes. Le complexe VirB représente le modèle de ce système de sécrétion. Il comporte au moins 5 protéines transmembranaires ou associées à la membrane cytoplasmique ou externe (VirB 6-10). La piline T d'*Agrobacterium tumefaciens* et la toxine pertussique de *Bordetella pertussis* (*plt*) [Weiss et coll., 1993] sont les systèmes représentatifs de la sécrétion de type IV. Le système VirB d'*A. tumefaciens* permet aussi la sécrétion de l'ADN-T. Le système de type V est un auto transporteur. La protéine possède un domaine N-terminal reconnu par le complexe Sec qui permet la translocation de la protéine dans le périplasma. La séquence signal est ensuite éliminée. Un second domaine (domaine passager) est transloqué à travers la membrane externe grâce au domaine C-terminal de la protéine qui crée un pore pour permettre la sécrétion du domaine passager qui est ensuite clivé pour être libéré dans le milieu [Henderson et coll., 2001]. Le système de type III est indépendant du complexe Sec. Il requiert une vingtaine de protéines dont un grand nombre situé dans la membrane cytoplasmique. Le système de type III permet la sécrétion de facteur de virulence tel que le

récepteur de l'intimine (Tir) de *E. coli* O157:H7 (EHEC) [Sperandio et coll., 1999]. De plus, Les protéines nécessaires à l'assemblage des flagelles sont homologues à celles du système de type III [Macnab, 1999].

Le système Tat représente un autre moyen de translocation des protéines à travers la membrane cytoplasmique. Il est composé de quatre protéines TatABCE probablement membranaires et de TatD une protéine soluble [Stanley et coll., 2001]. Les protéines exportées par ce système Tat possèdent une séquence signal en N-terminal contenant deux arginines conservées. Contrairement au système Sec, la sécrétion des protéines par le système Tat implique la présence de cofacteurs et nécessite que les protéines soient préalablement conformées. La protéine SufI, impliquée dans la division cellulaire, est exportée via le système Tat.

Trois voies différentes ont été identifiées pour insérer les protéines dans la membrane cytoplasmique : le translocon SRP/Sec, le translocon SRP/YidC ou YidC seul [de Gier et coll., 2001]. Le complexe SRP (*ffh*, ARN 4,5S) reconnaît une séquence en N-terminal hydrophobe sans que celle-ci soit bien déterminée. Le complexe SRP se fixe sur le N-terminal du polypeptide en cours de la biosynthèse mais son rôle de chaperon ou de mise en conformation n'est pas bien défini. La protéine FtsY reconnaît le complexe SRP-polypeptide-ribosome et doit probablement diriger ce complexe vers la membrane cytoplasmique pour permettre l'insertion de la protéine grâce au translocon SecAYEG ou à la protéine YidC. Lors de l'insertion des segments transmembranaires de la protéine, il s'avère que des phospholipides induisent l'activité GTPasique de la protéine FtsY et pourrait assurer une fonction de chaperon pour une insertion correcte de ces protéines membranaires [Bogdanov et coll., 1999], en particulier pour les phosphatidyléthanamines.

d) Transduction des signaux.

Les bactéries régulent l'expression de nombreux gènes suivant les conditions du milieu extérieur tels que la température, l'osmolarité, le pH, la présence de nutriment, *etc.* De nombreux signaux captés au niveau de l'enveloppe sont transmis vers le cytoplasme à l'aide de systèmes à deux composants protéique capteur/régulateur. Le capteur, situé dans la membrane cytoplasmique, perçoit le changement de l'environnement. Le capteur possède une activité histidine kinase qui permet la phosphorylation et la déphosphorylation du régulateur. Lors de l'activation, le capteur s'auto-phosphoryle (sur une histidine), puis transfère le groupement phosphate sur un résidu aspartate du régulateur cytoplasmique qui entraîne des

modifications de ses propriétés d'activateur transcriptionnel. Le système EnvZ/OmpR est l'un des paradigmes de ces systèmes capteur/régulateur.

II) La membrane externe.

La membrane externe est en contact direct d'un côté avec le milieu extérieur et de l'autre avec le périplasma. La membrane externe est formée d'une bicouche lipidique. Des phospholipides constituent le feuillet interne et des lipopolysaccharides (LPS), spécifiques de cette membrane, constituent le feuillet externe. La présence des LPS sur le feuillet externe, couplée à la présence de protéines, confère aux bactéries à Gram-négatif une plus grande résistance face aux détergents, aux composés toxiques liposolubles. La membrane externe possède une perméabilité sélective face aux composés hydrosolubles grâce à la présence de porines plus ou moins spécifiques [Nikaido, 1999a].

1) La bicouche lipidique.

Le feuillet interne est constitué exclusivement de phospholipides dont la structure est identique à celle des phospholipides de la membrane cytoplasmique, tout comme la composition en phospholipides avec un enrichissement en phosphatidyléthanolamine.

a) Les lipopolysaccharides.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont composés de trois parties (figure 2) : Le lipide A à caractère hydrophobe, le noyau et l'antigène O hydrophile exposé au milieu extérieur. Le lipide A est formé de deux glucosamines liées en β -1,6 sur lesquelles sont fixées six à sept résidus d'acides gras saturés hydroxylés [Kastowsky et coll., 1992].

Le lipide A semble indispensable à l'assemblage des LPS dans la membrane externe puisque c'est la structure minimale qui permet la formation du feuillet externe.

La chaîne de résidus de glucosamine est substituée par des groupements chargés tels que des résidus de phosphate et de 4-aminoarabinose avec une majorité de groupements anioniques. Le noyau est divisé en deux parties : le noyau interne très conservé est relié au lipide A et le noyau externe variable d'une espèce à une autre est relié à l'antigène O.

Le noyau interne est constitué de trois heptoses et trois acides α -ceto- 3-deoxy-octonique (KDO). Il est souvent substitué par des groupements chargés majoritairement anioniques (phosphate) comme le lipide A. Ces charges contribuent à une meilleure interaction entre les LPS par l'intermédiaire de cations divalents. Le noyau externe est constitué de deux glucoses, deux galactoses et d'une glucosamine.

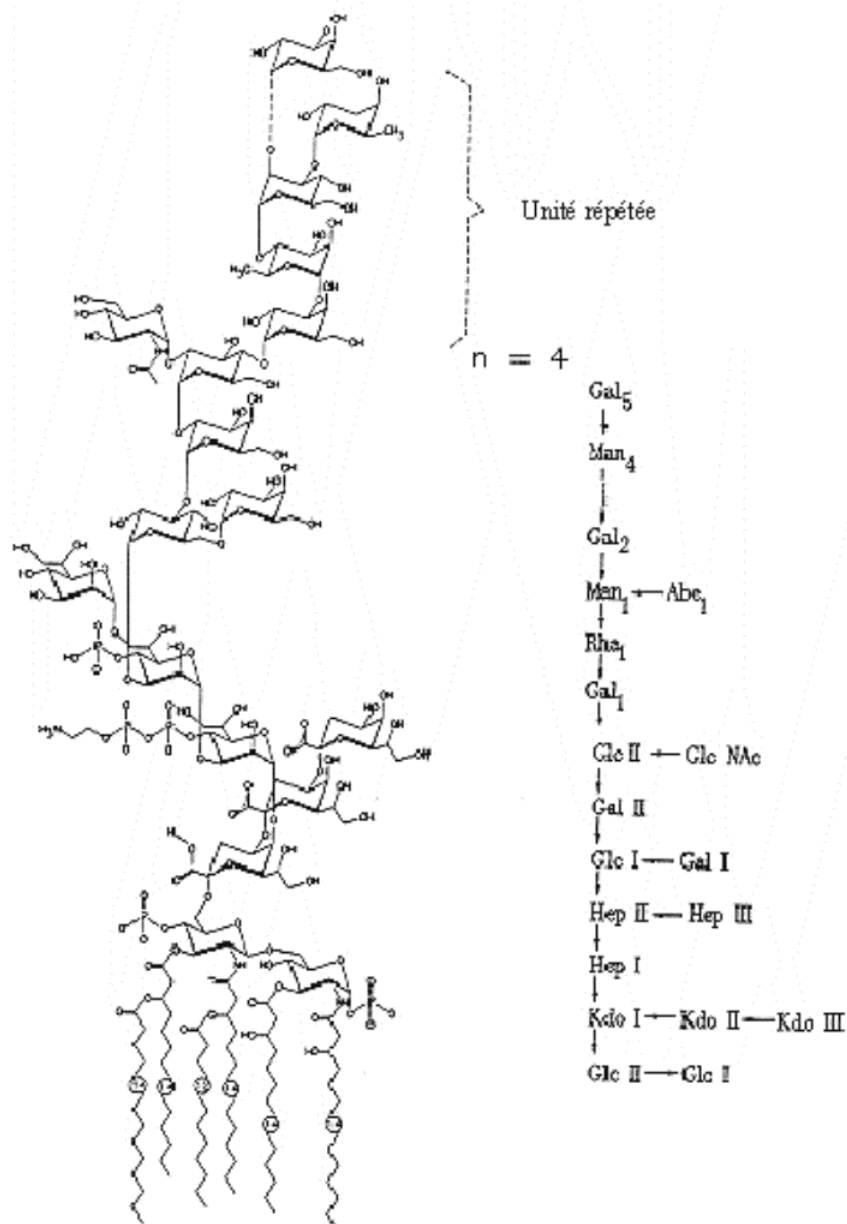


Figure2 : Structure du lipopolysaccharide chez *E. Coli* et *Salmonella* [Kastowsky et coll., 1992]. Le lipide A correspond à celui chez *E. coli*. Le noyau correspond à celui chez *S. typhimurium*. L'antigène O correspond à celui des espèces *Salmonella* du sérotype B. Glc: glucose, Gal: Galactose, Hep: Heptose Kdo: acide α -ceto- β -octionique.

L'antigène O est relié au glucose II du noyau externe par le galactose I. L'antigène O est formé de la répétition d'une unité oligosaccharidique très variable d'une souche à une l'autre. Il est formé de galactose, de mannose, de rhamnose et d'abéquose.

L'antigène O n'est pas indispensable à l'insertion des LPS dans le feuillet externe de la membrane externe ni à la fonction de barrière pour ce feuillet. Par contre, il est indispensable à la virulence des bactéries. Il pourrait intervenir dans le phénomène d'échappement à la phagocytose des bactéries [Nikaido, 1996]

La biosynthèse du LPS s'effectue au niveau de la membrane cytoplasmique. Le noyau est synthétisé par l'ajout successif des oses sur les LPS en cours de synthèse. Par contre, l'antigène O est synthétisé séparément, par les gènes *rfb*, sur le bactoprénol (C55-undecaprenol) puis transféré sur les LPS [Nikaido, 1999a].

b) L'antigène commun (ECA).

L'ECA (Enterobacterial Common Antigen) est présent chez toutes les entérobactéries. Il est formé d'une chaîne oligosaccharidique constituée de la répétition d'une unité trisaccharidique, de 18 à 55 fois. L'unité trisaccharidique est constituée d'une N-acétyl glucosamine, d'une N-acétyl mannosamide et d'une N-acétyl fucosamide. Il existe plusieurs formes d'ECA. La forme ECA_{pg} est liée de manière covalente à un diacylglycérol, par une liaison phosphodiester, inséré dans le feuillet externe de la membrane externe. La forme ECA_{LPS} est liée au niveau du noyau du LPS. La troisième, formée d'ECA cyclique ECA_{cyc}, a été découverte chez les espèces *Shigella sonnei*, *Yersinia pestis* et *Salmonella montevideo*. Les ECA_{LPS} et ECA_{cyc} ne sont pas identifiés chez toutes les entérobactéries contrairement à l'ECA_{pg} [Rick et coll., 1998].

2) Les protéines de la membrane externe.

L'analyse du génome *E. coli* prédit 39 protéines insérées dans la membrane externe. 78% des protéines ont été identifiées par électrophorèse bidimensionnelle à partir d'extraits de membrane externe [Molloy et coll., 2000]. Certaines de ces protéines sont identifiées en grande quantité comme OmpC, OmpF, OmpA et la lipoprotéine de Braun, d'autres sont en faible quantité comme les transporteurs spécifiques, les récepteurs de haute affinité, les protéines impliquées dans la sécrétion des protéines, etc. De plus, des protéines hypothétiques, dont l'expression n'avait pas encore été démontrée, ont été révélées à partir des électrophorèses bidimensionnelles.

a) Les porines.

Les porines OmpC et OmpF sont formées de trois sous-unités qui possèdent toutes trois un pore permettant le passage non spécifique de composés hydrosolubles d'une taille maximum de 600 da. Les pores de la porine OmpC sont légèrement plus petits que ceux de la porine OmpF. La quantité des deux protéines est en général constante, mais la proportion de l'une par rapport à l'autre varie suivant les conditions de milieu de culture. Les porines OmpC et OmpF contribuent fortement à la perméabilité de la membrane externe selon les conditions extérieures. L'augmentation de l'osmolarité, de la température, la présence de composés toxiques, de l'absence d'azote favorisent l'expression du gène *ompC* et répriment l'expression du gène *ompF*. La protéine EnvZ de la membrane cytoplasmique perçoit les changements d'osmolarité du milieu, s'auto-phosphoryle sur une histidine conservée, puis transfère le résidu phosphorylé sur la protéine OmpR cytoplasmique. Le niveau de phosphorylation de la protéine OmpR régule au niveau transcriptionnel le taux des protéines OmpF et OmpC de la membrane externe en activant préférentiellement le gène *ompF* à basse osmolarité et le gène *ompC* à haute osmolarité [Dutta et coll., 2000]. D'autres facteurs peuvent réguler l'expression des porines au niveau transcriptionnel comme IHF, RpoS, H-NS, AMPc/Crp ou au niveau traductionnel comme l'ARN anti-sens *micF*.

b) Les canaux spécifiques.

En plus des porines non spécifiques OmpF et OmpC, il existe des protéines qui forment des pores spécifiques de substrat. L'exemple le plus connu est la protéine trimérique LamB. Cette protéine possède un site de reconnaissance du maltose et des maltodextrines et permet leur passage à travers la membrane externe. Le substrat est ensuite pris en charge par la protéine MalE périplasmique qui dirige le substrat vers le transporteur (MalF, MalG) [Nikaido, 1996]. La protéine LamB, exposée au milieu extérieur, est utilisée comme récepteur par le phage lambda et permet l'adsorption du phage sur les bactéries. D'autres canaux de type porine sont utilisés pour capter d'autres éléments comme le phosphate (PhoE) ou les nucléosides (Tsx).

c) Les transporteurs de haute affinité.

Les transporteurs de haute affinité sont capables de capter des molécules présentes dans le milieu à de très faible concentration. Leur constante de dissociation est de l'ordre du μM voir du nM. Cette haute affinité permet de concentrer le substrat dans le périplasme jusqu'à 1000 fois par rapport à la concentration dans le milieu externe [Nikaido, 1996]. Dans

ces systèmes de transport à haute affinité, c'est le récepteur de la membrane externe qui détermine la spécificité du système de transport, contrairement au système de faible affinité où c'est la protéine périplasmique qui est considérée comme responsable de la spécificité du système de transport. Une fois le substrat capté dans le milieu, le récepteur subit un changement de conformation qui permet de transloquer le substrat dans le périplasma. La translocation nécessite de l'énergie qui provient de la force protomotrice transmise via la protéine TonB. Le récepteur BtuB [Bradbeer, 1993], permettant la capture de la vitamine B12 et le récepteur FhuA, permettant la capture du fer, font partie de cette classe de transporteurs à haute affinité.

d) La protéine OmpA.

La protéine OmpA est sous forme monomérique et est similaire aux porines OmpC et OmpF, mais seule une faible quantité de protéines OmpA possèdent un canal ouvert permettant le passage de molécules. *In vitro*, un canal a été mis en évidence qui possède une vitesse de pénétration deux fois inférieure à celle de la protéine OmpF. Le N-terminal de la protéine est organisé en un tonneau transmembranaire formé de feuillet β antiparallèles. Le C-terminal possède une structure en hélice α située dans le périplasma. La protéine OmpA ne possède pas un rôle important dans la perméabilité de la membrane externe. La protéine OmpA semble être impliquée dans la stabilisation la membrane externe [Nikaido, 1996]

e) La lipoprotéine de Braun.

La lipoprotéine de Braun (*lpp*) est une petite protéine de 7200 dal présente dans le feuillet interne de la membrane externe. La cystéine située en N-terminal de la protéine est substituée par une molécule de diacylglycérol sur le groupement sulfuryl et par une molécule d'acide gras sur le groupement amine. Ces trois acides gras sont probablement impliqués dans l'insertion de la lipoprotéine de Braun dans le feuillet interne de la membrane externe. La partie protéique est située dans le périplasma [Nikaido, 1996]. Environ un tiers des lipoprotéines de Braun est relié de manière covalente au peptidoglycane par le groupement amine de la lysine située en C-terminal de la lipoprotéine de Braun. La lipoprotéine de Braun est probablement impliquée dans le maintien de la structure de la membrane externe.

f) Insertions des protéines dans la membrane externe.

Les protéines destinées à être insérées dans la membrane externe utilisent le système Sec pour passer la membrane cytoplasmique. Il semblerait que les protéines soient

transitoirement localisées dans le périplasme et prises en charge par plusieurs protéines qui jouent un rôle dans la mise en conformation des protéines. La protéine DsbA permet la formation correcte des ponts disulfures. La protéine Skp joue un rôle de protéine chaperonne. La protéine SurA est une prolyl-cis-trans-isomérase [Kloser et coll., 1998]. L'interaction des protéines avec quelques LPS localisés dans la périplasme semble aussi nécessaire pour l'insertion des protéines dans la membrane externe, tout comme la composition en phospholipides du feuillet interne de la membrane externe. Mais la manière dont les lipides influencent l'insertion des protéines dans la membrane externe reste encore mal connue.

g) Les systèmes de sécrétion.

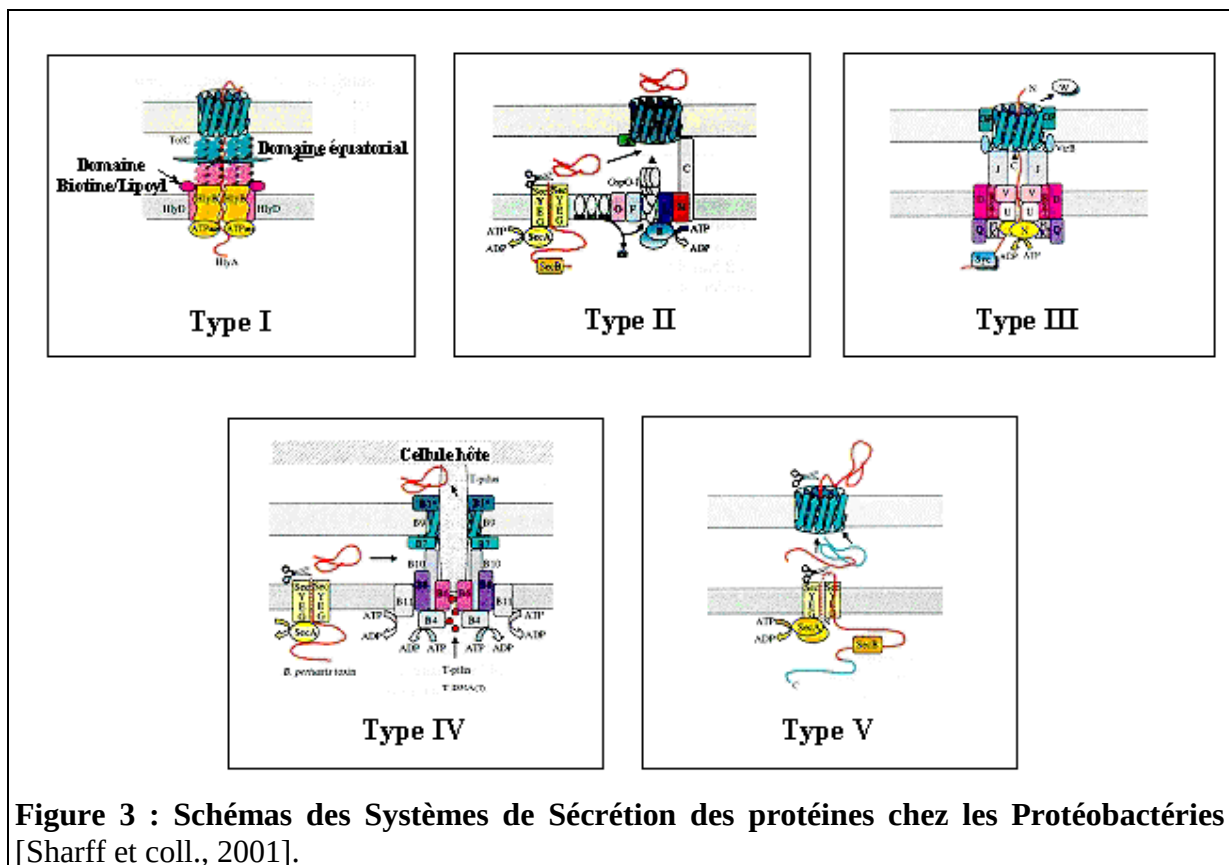
Les systèmes de sécrétion des protéines nécessitent le passage de deux membranes (figure 3). Pour les types II, IV et V, le translocon Sec permet le passage de la membrane cytoplasmique. Ensuite, des protéines spécifiques de chaque système prennent en charge les protéines, destinées à être sécrétées. Dans le système de type II, représenté par le système Out d'*E. chrysanthemi* [Shevchik et coll., 1997], OutD est située dans la membrane externe sous forme multimérique et permet la sécrétion des protéines. Les protéines OutS s'associent à la protéine OutD pour stabiliser la protéine OutD dans la membrane externe. Une mise en conformation préalable des protéines dans le périplasme semble être nécessaire pour une obtenir une sécrétion efficace. Les protéines membranaires OutC, K ou M permettent de signaler l'interaction de OutD avec une protéine en voie de sécrétion à la protéine cytoplasmique OutE, l'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la sécrétion.

Le système de type IV est représenté par le complexe VirB qui intervient dans la sécrétion de la piline T et de l'ADN-T chez *A. tumefaciens*. Les protéines VirB9 et VirB7 s'associent en hétérodimères et viennent se fixer dans la membrane externe. C'est le point de départ de l'assemblage du complexe VirB qui traverse les deux membranes pour permettre la sécrétion de la piline T et de l'ADN-T [Christie, 1997]. Des systèmes homologues sont identifiés chez *Helicobacter pylori* (*cag*) qui permet la sécrétion d'un facteur protéique activant la sécrétion de l'interleukine 8 ou chez *B. pertussis* (*ptl*) qui permet la sécrétion de la toxine pertussique.

Le système de type V est caractérisé comme un auto-transporteur. La protéine sécrétée forme elle-même un canal (domaine C-terminal) qui permet de faire traverser son domaine passager vers le milieu extérieur qui est libéré par le clivage de la protéine [Henderson et coll., 2001].

Le système de type I permet de sécréter la protéine en une seule étape à travers les

deux membranes.



Des protéines spécifiques permettent de traverser la membrane cytoplasmique et le périplasme.

Pour traverser la membrane externe, La protéine TolC forme un canal capable d'interagir avec plusieurs systèmes de type I et permet le passage de la protéine vers le milieu extérieur [Sharff et coll., 2001]. L' α -hémolysine (HlyA) d'*E. coli*, l'adénylylcyclase de *B. pertussis* utilisent ce système de sécrétion. Des systèmes de pompe à reflux permettant l'élimination de toxines liposolubles sont homologues au système de sécrétion de type I comme le système Acr qui permet l'exclusion d'antibiotiques liposolubles, de détergents, etc.

Le système de type III est rencontré chez les bactéries pathogènes et permet de sécréter directement les protéines dans la cellule hôte. *E. coli* EPEC entéropathogène possède un locus LEE qui renferme les gènes du système de sécrétion de type III (*sep*, *esc*). La protéine SepA (YscV chez *Y. pseudotuberculosis*) et la protéine SepC (YscC chez *Y. pseudotuberculosis*) forme respectivement deux anneaux dans la membrane cytoplasmique et dans la membrane externe. La protéine SepD (homologue de YscJ chez *Y. pseudotuberculosis*) est un constituant de l'axe permettant de relier ces deux anneaux. Ces protéines forment une structure semblable au corps basal des flagelles. La protéine SepB

(YscC chez *Y. pseudotuberculosis*) est l'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation des protéines dans le milieu extérieur. Ce complexe permet la sécrétion des protéines EspF (YscF) qui constituent une aiguille à l'extrémité du sécréton de type III. Les protéines EspA, sécrétées par le système de type III, se fixent à l'extrémité de l'aiguille et se polymérisent pour constituer un pont entre la bactérie et la cellule hôte. Les protéines Tir, EspB et EspD sont ensuite sécrétées par cette structure.

III) Le périplasme.

Le compartiment périplasmique est bordé d'un côté par la membrane cytoplasmique et de l'autre par la membrane externe. Sa composition se distingue du cytoplasme à la fois dans la nature des polymères, des protéines et des ions. Les composants du périplasme jouent un rôle important dans la coordination des systèmes qui régulent la physiologie des Protéobactéries. Les protéines périplasmiques sont impliquées dans la détection et l'assimilation des nutriments dans la cellule, dans la modification post-traductionnelle des protéines, dans la synthèse du peptidoglycane, des composés protéiques, glucidiques et lipidiques de la membrane externe, *etc.* La composition du périplasme est régulée pour adapter la bactérie aux conditions extérieures.

1) Structure du périplasme.

a) Le volume périplasmique.

Le périplasme a été visualisé en microscopie électronique utilisant des méthodes de cryofixation. Les résultats ont permis d'estimer une épaisseur de 13 à 25 nm soit 8% à 16% du volume de la cellule [Graham et coll., 1991]. Cette variation de volume est due au changement de l'osmolarité et à la préparation des cellules analysées en microscopie. D'autres approches ont été utilisées pour mesurer le volume du périplasme. Des composés radio-marqués possédant des propriétés différentes de diffusion à travers l'enveloppe bactérienne ont été utilisés [Stock et coll., 1977] [Cayley et coll., 2000]. Le volume du périplasme a alors été estimé entre 20% et 40 % du volume d'eau de la cellule.

La consistance du périplasme a été assimilée à un gel [Hobot et coll., 1984]. Ce modèle est basé sur la structure en réseau du peptidoglycane et la variabilité de son taux de polymérisation. Une solution aqueuse de protéines, d'oligosaccharides, est associée au peptidoglycane. Ce modèle explique la mobilité réduite de protéines fluorescentes dans le périplasme par rapport à une solution aqueuse ou au cytoplasme. La faible diffusion des

composés dans le périplasma pourrait expliquer la différence de volume estimée par les deux méthodes ci-dessus. Par contre, la diffusion des OPG chez *Ralstonia solanacearum* a montré qu'une partie majoritaire des OPG diffuse de manière similaire à des OPG dans une solution aqueuse et qu'une autre partie est associée aux protéines ou à la membrane. Ces données suggèrent une variabilité de la viscosité périplasmique propice à la formation de microenvironnements favorables à l'activité des enzymes présentes dans le périplasma.

E. coli est capable de supporter et de croître dans une large gamme d'osmolarité allant de 0,015 osM à 3 osM. La variation de l'osmolarité intracellulaire engendre des changements de volume dans les compartiments de la cellule. A basse osmolarité, la cellule est turgescente et le volume de la cellule et du cytoplasme est grand, par contre le volume du périplasma est faible. A haute osmolarité, le volume de la cellule diminue tout comme celui du cytoplasme, par contre le volume du périplasma augmente ; la cellule devient plasmolysée [Cayley et coll., 2000]. Le peptidoglycane supporterait les principales contraintes physiques provoquées par les variations de la pression osmotique. La membrane cytoplasmique ne subirait quasiment aucune contrainte physique. Ceci implique que le périplasma et le cytoplasme soit iso-osmotique. Pour permettre cela, des changements de l'osmolarité intracellulaire engendrés par la modification de la quantité en eau et en solutés dans le cytoplasme et le périplasma permettent de maintenir la pression de turgescence constante et l'iso-osmolarité entre le périplasma et le cytoplasme sur une large gamme d'osmolarité [Stock et coll., 1977].

Pour éviter la perte d'eau du cytoplasme à haute osmolarité, le transport des composés ioniques, comme les ions K^+ vers le cytoplasme, est activé pour augmenter l'osmolarité du cytoplasme et ajuster la pression osmotique à celle du périplasma. Le glutamate est synthétisé pour contrer les charges apportées par les ions K^+ dans le cytoplasme. Le tréhalose, la glycine-bétaïne sont aussi synthétisés pour éviter un apport trop important d'ions K^+ [Oliver, 1996].

A basse osmolarité, des ions K^+ et du tréhalose sont libérés dans le périplasma puis dans le milieu extérieur. Le volume du périplasma diminue fortement. La pression osmotique du périplasma semble être maintenue grâce au potentiel de Donnan [Stock et coll., 1977] dû à la présence des ions Na^+ et Cl^- . Les OPG sont accumulés dans le périplasma à basse osmolarité pour atteindre 5% du poids sec de la bactérie. Les OPG portant des charges anioniques chez *E. coli* ont été proposés pour maintenir le potentiel de Donnan en captant les ions Na^+ . Mais l'absence d'OPG n'empêche pas les bactéries de croître à basse osmolarité. Les OPG ne participent pas de manière significative à la régulation du potentiel de Donnan. D'autres systèmes physiologiques permettent probablement cette régulation.

b) Les sites d'adhésion.

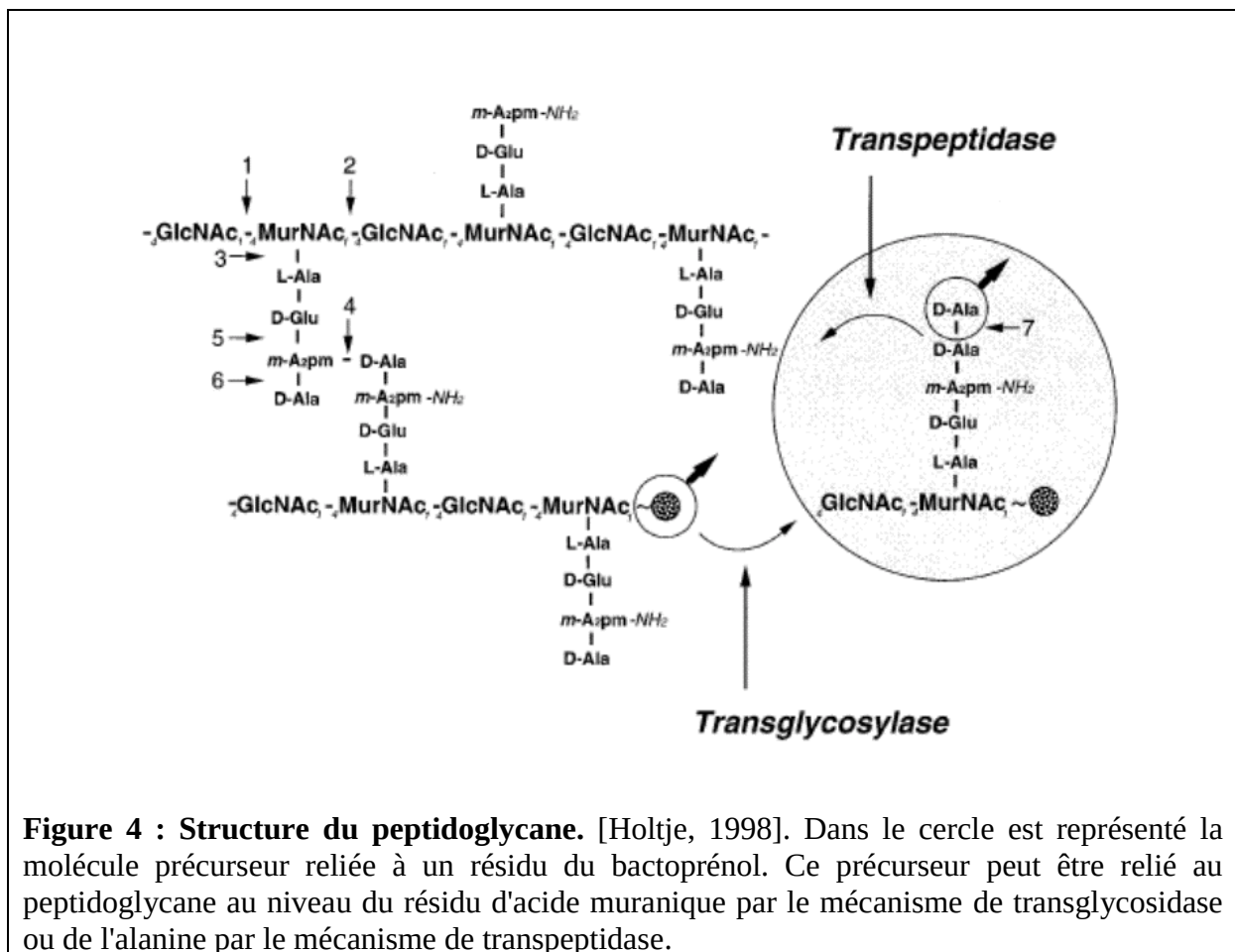
Lors de l'augmentation de l'osmolarité (saccharose 25%), un détachement de la membrane cytoplasmique de la paroi est observé excepté au niveau de sites d'adhésion (sites de bayer) [Woldringh, 1994] estimés entre 200 et 400. Ces sites retiennent la membrane cytoplasmique au peptidoglycane et à la membrane externe [Park, 1996]. Plusieurs hypothèses ont été émises pour la fonction de ces sites d'adhésion. Les sites d'adhésion se formeraient à des sites prédéfinis qui permettraient de localiser le développement des structures de l'anneau septal pour initier la division cellulaire [Cook et coll., 1994]. La localisation et l'importance de ces zones de renflement dans l'initiation de la division sont contestées par le fait qu'aucune structure permettant de prédéfinir le site d'adhésion n'a été mis en évidence [Woldringh, 1994]. Woldringh et coll. suggèrent que la réplication et la ségrégation du nucléoïde initie la division cellulaire. Ces sites d'adhésions pourraient être le lieu de transport des molécules destinées à la membrane externe. La formation de ces sites d'adhésion est très controversée, Woldringh et coll. parlent d'une distribution aléatoire de sites tandis que Cook et coll. émettent l'hypothèse d'une localisation prédéfinie de ces sites. Les résultats montrent toutefois que la localisation des sites dépend des propriétés physiques de l'enveloppe qui nécessite des réarrangements dans sa structure et sa composition lors de l'augmentation de l'osmolarité ou de la réplication.

2) Le saccule de muréine.

Le saccule de muréine forme un sac rigide situé dans le périplasme et est relié à la membrane externe. Il contient un polymère appelé muréine organisé en un réseau dense qui permet de protéger la membrane cytoplasmique de la pression de turgescence. Il est aussi responsable de la forme de la bactérie [Park, 1996].

Le polymère de muréine est constitué de longues chaînes glycaniques formées par l'association d'une trentaine de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétyl-muranique reliés par des liaisons β -1,4 (figure 4). Un oligopeptide formé par l'association de résidus de L-alanine, D-isoglutamate, L-méso-diaminopimelyl-D-alanine et de D-alanine dans cet ordre se fixe sur l'acide N-acétyl-muranique par le résidu d'alanine. Ces chaînes peptidoglycaniques sont reliées entre elles par des liaisons covalentes entre la L-méso-diaminopimelyl-D-alanine d'une chaîne et la D-alanine d'une autre chaîne. Le pourcentage de liaisons varie suivant les conditions de culture. Ces liaisons covalentes permettent en majorité de former des dimères mais aussi des trimères (5%) voire des tétramères (<1%) [Holtje, 1998].

La muréine est aussi reliée aux lipoprotéines de Braun qui sont insérées dans la membrane externe, ce qui permet au sacculus de muréine d'être très proche de la membrane externe. Cette liaison covalente s'effectue entre le groupement L-carboxylique du résidu L-méso-diaminopimétyl-D-alanine et le groupement amine d'une lysine ou d'une arginine de la lipoprotéine de Braun.



La biosynthèse du polymère de muréine s'effectue dans le cytoplasme, la membrane cytoplasmique et dans le périplasme. La UDP-mur-Nac est tout d'abord substituée par les cinq acides aminés puis ce composé est fixé sur le bactoprénol (lipide I) et la N-acétyl glucosamine est fixée à l'acide N-acétyl muranique (lipid II). Ce disaccharide-pentapeptide est transloqué dans le périplasme puis allongé par l'ajout d'autres disaccharides (7 à 8 unités) dans le périplasme. Cette structure est transférée du bactoprénol vers le sacculus de muréine grâce aux enzymes PBP1A/B/C,2,3. Cette étape est appelée la transglycosilation. Les chaînes de muréine sont reliées entre elles par la réaction de transpeptidation.

Durant la croissance, le sacculus de muréine est constamment en évolution pour

permettre la croissance et la division cellulaire. Deux systèmes permettant cette évolution du saccule de muréine ont été mis en évidence. Le premier système est impliqué dans la croissance de la cellule. Le second système permet la formation du septum et des pôles de la bactérie lors de la division cellulaire [Holtje, 1998].

3) Les protéines du périplasma.

Le périplasma permet de faire la transition entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique, il renferme donc un grand nombre de protéines qui permettent de faire la liaison entre les deux membranes [Oliver, 1996]. Les protéines peuvent être classées selon leur fonction. Les protéines spécifiques de sucres, d'acides aminés, de peptides, de vitamines ou d'ions qui fonctionnent en coordination avec les systèmes de transport ABC situés dans la membrane cytoplasmique et avec les canaux spécifiques de substrat situés dans la membrane externe. C'est le cas de MalE qui capte le maltose apporté par la protéine LamB et le conduit jusqu'au transporteur de la membrane cytoplasmique (MalGF) [Benz et coll., 1992].

Des protéines périplasmiques permettent la dégradation des molécules complexes en molécules simples pour être transportées à travers la membrane cytoplasmique. Un grand nombre de molécules organophosphatées entre dans le périplasma. Diverses phosphatases spécifiques ou non selon les conditions de milieu permettent la libération du phosphate organique sous sa forme inorganique Pi qui est envoyé dans le cytoplasme par le système de transport du phosphate [Wanner, 1996].

Les bactéries sont soumises à des composés toxiques. Des systèmes de détoxification ont été développés pour contrer l'effet de ces molécules. Ainsi, la β -lactamase (BlaM) d'*E. coli* permet le clivage de la pénicilline et autres antibiotiques de la famille des β -lactames.

Une grande famille regroupe toutes les protéines impliquées dans la biogenèse de l'enveloppe comme la protéine MdoG nécessaire à la synthèse des OPG périplasmiques [Lacroix et coll., 1991], les protéines nécessaires à la synthèse et à l'exportation des LPS ou encore impliquées dans la mise en conformation des protéines. Deux types de protéines ont été identifiés comme étant impliquées dans la mise en conformation des protéines périplasmiques. Les peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (*ppi*) qui permettent d'initier la mise en conformation des protéines au niveau des prolines et les protéines disulfure oxydases, réductases et isomérases (*dsb*). Six gènes *dsb* ont été identifiés (*dsbABCDE*). La protéine majoritaire impliquée dans la formation des ponts disulfures est DsbA. Elle permet la formation des ponts disulfures en réduisant deux résidus de cystéine. La protéine DsbA est réoxydée par l'intermédiaire de la protéine DsbB qui est elle-même régénérée par une quinone

de la membrane cytoplasmique [Missiakas et coll., 1997a]. D'autres gènes que les gènes *dsb* ont été mis en évidence dans l'oxydation des protéines périplasmiques. Il s'agit du gène *ompL* qui code une porine de la membrane externe. Une molécule de faible poids moléculaire serait oxydée et/ou réduite par la protéine DsbB. La porine OmpL serait impliquée dans l'élimination de molécules de faible poids moléculaire lors de l'accumulation excessive de molécules réduites ou oxydées [Dartigalongue et coll., 2000].

Le système Tol-Pal est composé de 7 protéines codées par deux opérons adjacents. Ces protéines semblent être impliquées dans la stabilité de l'enveloppe et dans l'entrée de certaines colicines et de phages (protéines TolQRAB) [Lazzaroni et coll., 1999]. La protéine TolQ est située dans la membrane cytoplasmique, les protéines TolR et TolA sont insérées dans la membrane cytoplasmique et possèdent un large domaine périplasmique, la protéine TolB est localisée dans le périplasme et la protéine Pal est une lipoprotéine insérée dans la membrane externe. Les protéines TolQ R, A et B sont impliquées dans l'entrée des colicines du groupe A [Lazdunski et coll., 1998]. Les protéines TolB et Pal sont capables d'interagir entre elles, Pal interagit avec le peptidoglycane, TolB avec la Lpp et OmpA avec deux protéines associées au peptidoglycane. Les protéines TolB, Pal, Lpp et OmpA pourraient participer au rapprochement du peptidoglycane et de la membrane. Les mutations dans les gènes *tol* ou *pal* entraînent des phénotypes pléiotropes. Ces mutations entraînent une tolérance aux colicines, la libération de protéines périplasmiques, une sensibilité accrue aux sels biliaires, l'hyperexpression d'acides colaniques, la formation de vésicules de membrane externe, influence la composition des LPS et l'expression des porines (OmpC) [Lazzaroni et coll., 1999] [Gaspar et coll., 2000], un défaut dans la division cellulaire, la perte de virulence de certains pathogènes [Heilpern et coll., 2000] etc. Ces protéines Tol-Pal pourraient être impliquées dans le maintien de la structure de l'enveloppe, la mise en place de LPS, des porines ou le positionnement du septum.

IV) Les Structures associées à la membrane externe.

1) Les Exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides (EPS) associés à la membrane externe sont des déterminants antigéniques. Nommés K, ils sont divisés en quatre groupes chez *E. coli*. Les EPS d'*E. coli* du groupe 1 sont des polysaccharides acides et sont trouvés sous deux formes. Des molécules de faible poids moléculaire sont associées au lipide A du LPS ; et des molécules de haut poids

moléculaire forment la structure de la capsule [MacLachlan et coll., 1993].

Le groupe 4 représente un sous-ensemble du groupe 1 K et des polysaccharides de surface appelés antigène O de la capsule puisque le premier antigène O a été identifié sous forme lié des LPS (50%) et associé à la capsule (50%) [Goldman et coll., 1982]. Les antigènes du groupe 4 peuvent renfermer des sucres contenant des groupements amido-acétiques.

Les antigènes du groupe 2 localisés dans la capsule sont reliés à la cellule par un acide α -glycérolphosphatidique dans certaines souches d'*E. coli* [Whitfield et coll., 1999]. Les antigènes du groupe 3 sont très proches de ceux du groupe 2 mais différent par des caractéristiques génétiques. Ils sont aussi reliés à la cellule via une molécule d'acide α -glycérolphosphatidique.

La synthèse de la capsule nécessite des résidus de sucre activés par de l'UDP comme précurseur contenu dans le cytoplasme. La synthèse s'effectue sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. Les polymères sont alors transloqués à travers la membrane externe [Whitfield et coll., 1999].

L'acide colanique est proche des polysaccharides du groupe 1. Elle est nommée aussi antigène M. Les gènes *cps* sont responsables de la synthèse de l'acide colanique présent chez *E. coli* K12. L'expression de l'acide colanique est régulée via deux voies. Le système capteur/régulateur RcsC/RcsB permet d'activer la transcription des gènes *cps* en réponse à divers stimulus environnementaux comme la dessiccation ou le choc osmotique. La protéine RcsA en association avec RcsB peut activer la transcription des gènes *cps*. Le gène *rcaA* est régulé par la protéine H-NS via un atténuateur de transcription et l'ARN du gène *DrsA* agissant comme ARN anti-sens pour débloquer l'atténuateur. La concentration des OPG dans le périplasma a été proposée pour indiquer les variations de l'osmolarité au capteur membranaire RcsC. A basse osmolarité, les OPG sont présents en grande quantité et les gènes *cps* ne sont pas activés. A haute osmolarité, les OPG sont en faible quantité et les gènes *cps* sont alors activés [Ebel et coll., 1997].

2) La couche S

La couche S entourant la bactérie peut former une pellicule de 5 à 25 nm d'épaisseur. Elle est constituée de protéines et ou de glycoprotéines formant une zone cristalline dans un système géométrique oblique, carré ou hexagonale. La couche S peut être liée au LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. La couche S forme un cristal dynamique évoluant selon la croissance et la division cellulaire. La couche S pourrait participer à

l'adhésion des bactéries sur la cellule hôte ou former une barrière de protection [Sara et coll., 2000].

3) Le flagelle.

Le flagelle est divisé en trois parties : la partie basale située dans l'enveloppe, un crochet relié à la partie basale et le filament. La partie basale est formée de quatre anneaux. Deux anneaux M et S, codés par la protéine FliF, insérés dans la membrane cytoplasmique. Les anneaux L et P sont insérés dans la membrane externe et codés respectivement par les protéines FlgH et FlgI. Un complexe Mot (MotA, MotB) relié au peptidoglycane entoure ces quatre anneaux pour stabiliser la partie basale dans l'enveloppe. L'anneau C, situé dans le cytoplasme constitue le moteur du flagelle (FliG, FliM et FliN). L'anneau C permet le couplage avec la force protomotrice qui fournit l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle. Un axe (FlgB, FlgC, FlgF et FlgG) traverse le moteur, la partie basale jusqu'au crochet. Le crochet (FlgE) permet de connecter le filament à la cellule. Le filament relié au crochet par l'intermédiaire des protéines FlgK et FlgL est formé par la polymérisation de la flagelline FliC [Macnab, 1999] [Macnab, 1996].

Plus de 50 gènes sont nécessaires à la synthèse des flagelles et à sa régulation. Ces gènes sont transcrits en opérons et classés en trois groupes selon le moment de leur activation : Les gènes précoces, intermédiaires et tardifs. Les gènes précoces *flhDC* sont inclus dans un grand opéron *flh*. Les protéines FlhC et D forment un hétérodimère et recrutent le facteur σ^{70} pour initier la transcription des gènes intermédiaires (*flg*, *fli*) et tardifs (*flg*, *fli*, *mot*, *tar*, *che*, *tsr*, *aer*). Les gènes intermédiaires codent les protéines d'assemblage et structurales requises pour le crochet. Le gène intermédiaire *fliA* code le facteur de transcription alternatif σ^{28} requis pour la transcription des gènes tardifs. Les gènes tardifs codent les protéines du filament. La protéine FlgM se fixe au facteur σ^{28} pour empêcher la transcription des gènes tardifs jusqu'à ce que l'assemblage du crochet soit total. Ensuite FlgM est sécrétée et la transcription des gènes tardifs est initiée [Chilcott et coll., 2000].

Les flagelles sont répartis sur toute la cellule chez *E. coli*. Les bactéries sont dites péritriches. La rotation du flagelle permet le déplacement de la bactérie. Ce déplacement s'effectue par une alternance de période de motilité et de culbute régulée par la présence de substances attractives ou répulsives détectées par les protéines membranaires impliquées dans le chimiotactisme. Les protéines de la partie basale sont homologues aux protéines du système de sécrétion de type III. Ce complexe permet la sécrétion du facteur σ^{28} , des protéines du crochet, du filament.

4) Les pili.

Les pili sont des structures permettant l'attachement des bactéries aux cellules hôtes. Il existe plusieurs types de pili dans une même bactérie nécessaire à différents stades de l'infection des cellules hôtes. La coordination de l'expression de ces différents pili est donc cruciale pour l'infection efficace des cellules hôtes. Les pili sont insérés dans l'enveloppe, mesurent de 1 à 2 μm et sont répartis sur toute la cellule. La partie émergente est constituée par la polymérisation de la piline. Une adhésine, située à l'extrémité du pili, permet de reconnaître des récepteurs spécifiques. Les pili ne sont pas impliqués dans la motilité des bactéries, excepté pour les pili de type IV, responsables de la motilité dite "twitching motility" [low et coll., 1996]. Les pili jouent donc un rôle dans l'adhésion des bactéries avec les cellules hôtes qu'elles soient eucaryote ou bactérien dans le cas du pili de type F nécessaire à la conjugaison entre deux bactéries.

B) Les glucanes périplasmiques osmorégulés.

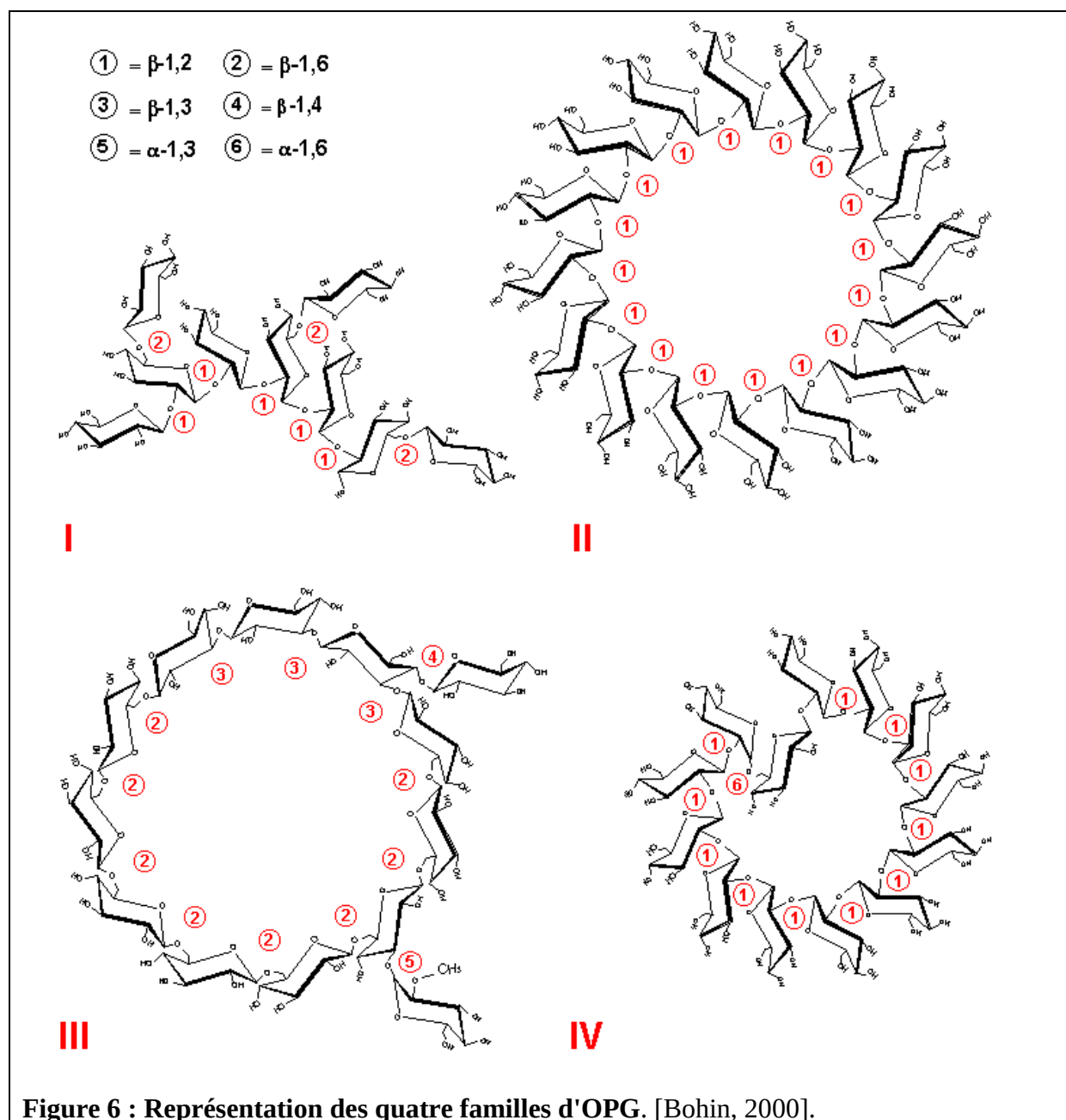
Les glucanes périplasmiques osmorégulés ou OPG (Osmoregulated Periplasmic Glucans) sont présents chez toutes les Protéobactéries qui ont été testées. Ces composés ubiquistes, situés dans le périplasme, possèdent des caractéristiques communes identifiées dans l'ensemble des molécules d'OPG identifiées. Le glucose est le seul sucre présent et forme le squelette glucosidique des molécules d'OPG. La taille de ces molécules est relativement faible allant de 5 à 24 résidus de glucose. Les résidus de glucose sont reliés en majorité par des liaisons de type β -glucoside et la concentration des OPG augmente d'autant plus que l'osmolarité du milieu diminue.

La première mise en évidence des OPG a probablement été réalisée par McIntire et coll. en 1942 [McIntire et coll., 1942] en caractérisant des glucanes cycliques liés en β -1,2 à partir de filtrats de culture de l'espèce *A. tumefaciens*. Ces glucanes ont été répertoriés comme une sous-fraction des exopolysaccharides. Ensuite, les OPG de l'espèce *E. coli* ont été mis en évidence en 1973 [Van Golde et coll., 1973] lors de l'étude du renouvellement des phospholipides. Le renouvellement des phospholipides est associé au transfert de résidus de phosphoglycérol de la membrane cytoplasmique vers des oligosaccharides périplasmiques qui ont donc été nommés MDO (Membrane-Derived Oligosaccharides). L'osmorégulation des β -glucanes d'*A. tumefaciens* et des MDO d'*E. coli* a mis en évidence un caractère commun entre ces deux molécules [Miller et coll., 1986]. Ces composés périplasmiques ont été regroupés sous le même nom OPG [Bohin, 2000]. Les OPG sont des composés à part entière du périplasme. Selon les espèces, la présence d'OPG dans le milieu extracellulaire a été détectée suivant les conditions de culture. La quantité d'OPG secrétée dépend à la fois du milieu de culture, de la phase de croissance et de l'espèce considérée. Chez *Erwinia. chrysanthemi*, les OPG secrétés n'ont pas de rôle dans la virulence de ces bactéries vis-à-vis des tubercules de pomme de terre [Page et coll., 2001]. Par contre chez *Bradyrhizobium japonicum*, les OPG extracellulaires semblent interagir avec un récepteur situé sur la plante hôte [Bhagwat et coll., 1999].

Les OPG ont été décrits chez de nombreuses bactéries à Gram négatif appartenant aux subdivisions alpha, bêta ou gamma des Protéobactéries (figure 5). Si les OPG partagent des caractéristiques communes (squelette glucosidique plus au moins substitué), ils possèdent néanmoins des particularités tant au niveau de la structure du squelette glucosidique que de la substitution.

Espèce	Famille d'OPG	Substituants	Similitude (%)		
			MdoG	MdoH	NdvB
Subdivision gamma					
<i>Escherichia coli</i>	I	P-Gro P-Etn Suc	100 30	100	<5
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	96 30	94	<5
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	I	Suc Ace	82	71	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	66	59	<5
<i>Pseudomonas syringae</i>	I	Aucun	68	62	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	38	23	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	32	22	<5
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	<5	<5	<5
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	<5	<5	<5
<i>Xanthomonas citri</i>	IV	-	32	23	<5
<i>Xylella fastidiosa</i>	-	-	32	22	<5
Subdivision bêta					
<i>Ralstonia solanacearum</i>	IV	Aucun	-	-	-
<i>Bordetella pertusis</i>	-	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	-	-	-	-
<i>Nitrosomonas europaea</i>	-	-	88	90	-
Subdivision alpha					
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	IV	Suc Ace	34	17	+
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	-	-	35	17	-
<i>Brucella abortus</i>	II	Aucun	-	-	51
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	II	P-Gro Suc MeMal	-	-	100
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	III	P-Cho	-	-	-
<i>Azospirillum brasilense</i>	III	Suc	-	-	11
<i>Caulobacter crescentus</i>	-	-	-	19	-
<i>Rickettsia prowazekii</i>	-	-	<5	<5	<5

Figure 5 : Classification des OPG et similitude des gènes de biosynthèse chez les Protéobactéries. [Bohin, 2000]



1) Structure des glucanes périplasmiques osmorégulés.

Quatre familles d'OPG ont été définies sur la base de la structure du squelette glucosidique (figure 6).

1) Les OPG de la famille I.

Les OPG de la famille I sont représentés par les OPG de l'espèce *E. coli*. Ces OPG sont formés d'un squelette glucosidique constitué par une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 et ramifiée par des résidus de glucose liés en β -1,6. Leur taille varie de 5 à 12 résidus de glucose par molécule, avec une espèce majoritaire constituée de 8 à 9 résidus de glucose par molécule. Des structures très similaires, variant légèrement dans le degré de branchement, ont été mises en évidence chez des bactéries de la subdivision gamma tels que *E. chrysanthemi* [Cogez et coll., 2001], *Pseudomonas syringae* [Talaga et coll., 1994]. Jusqu'à présent, cette structure du squelette glucosidique n'a été identifiée que chez des espèces de la subdivision gamma.

2) Les OPG de la famille II.

Les OPG de la famille II sont très représentés chez les Rhizobiacées (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) et chez *Brucella abortus* [Breedveld et coll., 1994]. Les squelettes glucosidiques sont cycliques et leur taille, relativement grande par rapport à la famille I, varie de 17 à 25 résidus de glucose d'une espèce à l'autre. Ils renferment uniquement des liaisons β -1,2. Pour une même espèce, une grande hétérogénéité en taille est aussi observée.

3) Les OPG de la famille III.

Les OPG de la famille III sont présents chez les espèces *Bradyrhizobium* appartenant à la famille des Rhizobiacées. Le squelette glucosidique est un cycle renfermant 10 à 13 résidus de glucose reliés par des liaisons β -1, 6 et β -1,3. La taille du squelette glucosidique chez ces espèces est très stricte. Le squelette glucosidique circulaire des OPG de *B. japonicum* est formé en moyenne par l'enchaînement de triplet de résidus de glucose liés en β -1,3 et d'un triplet de résidus de glucose liés en β -1,6 auquel vient s'ajouter une branche formée d'un résidu de glucose lié en 1,3 sur le carbone 6 d'un résidu de glucose du cycle [Rolin et coll., 1992]. La structure du squelette glucosidique des OPG de *Azospirillum brasilense* est très semblable. Par contre, trois types de squelette ont été identifiés à l'aide de méthodes plus

résolutives.

Le type I possède un cycle de 12 résidus de glucose liés par trois liaisons en β -1,3 et huit en β -1,6 puis d'une branche formée par un treizième résidu de glucose relié en β -1,4. Le type II possède une structure de type I à laquelle vient s'ajouter une deuxième branche formée d'un résidu de glucose lié en α -1,3. Le type III, fondé sur le type II, possède un groupement 2-O-méthyl sur le résidu de glucose lié en α [Bohin, 2000].

4) Les OPG de la famille IV.

Le squelette glucosidique de la famille IV est cyclique et possède un degré de polymérisation unique. Le cycle est formé de résidus de glucose dont un est lié en α -1,6 et les autres en β -1,2. La présence de la liaison α -1,6 induit une contrainte dans la molécule qui contraste avec la flexibilité rencontrée dans le squelette de la famille II [Lippens et coll., 1998]. Ces squelettes glucosidiques sont identifiés dans les OPG synthétisés dans les espèces *Ralstonia. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* [Talaga et coll., 1996] et *Rhodobacter sphaeroïdes* [Talaga et coll., 2002]. Les OPG de ces espèces possèdent respectivement des squelettes glucosidiques de 13, 16 et 18 résidus de glucose par molécule.

5) La substitution des OPG.

Lorsqu'il est substitué, le squelette glucosidique peut l'être par une grande variété de substituants donnant soit un caractère anionique, cationique ou neutre. Les substituants proviennent de deux voies : les substituants provenant des phospholipides de la membrane cytoplasmique comme les résidus de phosphoglycérol, de phosphoéthanolamine et de phosphocholine ; et les substituants provenant du métabolisme intermédiaire comme les résidus acétyl, succinyle, et méthylmalonyl. Les dérivés acyl-CoA du métabolisme intermédiaire pourraient être les molécules donatrices.

Chez *E. coli*, les OPG produits sont à la fois hétérogène en taille, dans le taux et la nature des substituants. La majorité des OPG possèdent un caractère anionique plus ou moins important, mais 1 à 2% des OPG sont neutres [Lacroix et coll., 1999].

II) Biosynthèse des OPG.

1) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille I

Les gènes responsables de la biosynthèse des OPG de la famille I sont représentés par les gènes *mdo* identifiés chez *E. coli*. Un locus *mdoA* indispensable à la biosynthèse des OPG

a été identifié à 23 min sur le chromosome *E. coli* entre les gènes *putA* et *pyrC* [Bohin et coll., 1984b]. L'étude du locus *mdoA* a permis d'identifier deux gènes *mdoG* et *mdoH* organisés en opéron dans cet ordre. Ces deux gènes sont indispensables à biosynthèse des OPG [Lacroix et coll., 1991]. Le gène *mdoH* code une protéine transmembranaire de 97 kda possédant 8 segments transmembranaires (figure 7). Trois larges domaines cytoplasmiques ont été décrits. Le premier domaine noté C1 possédant 138 acides aminés est situé en N-terminal. Le domaine C2 possède 303 acides aminés et le domaine C3 situé en C-terminal possède 146 acides aminés. La protéine MdoH possède peu d'acides aminés orientés vers le périplasma. Deux boucles périplasmiques formées de 32 et 33 acides aminés sont localisées respectivement entre les segments transmembranaires II et III et entre les segments transmembranaires III et IV. La protéine MdoH est capable de synthétiser *in vitro* une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2. De l'UDP-glucose comme substrat, de l'ACP (Acyl Carrier Protein) et un β -D-glucoside comme amorce sont nécessaires pour la synthèse, *in vitro*, de cette chaîne linéaire. L'octyl- β -D-glucoside représente la meilleure amorce pour l'initiation de chaîne linéaire β -1,2 dans le test *in vitro* [Weissborn et coll., 1984]. Le blocage de la fonction aldéhyde du carbone C1 du résidu de glucose dans la liaison avec le résidu octyl suggère que l'élongation de la chaîne linéaire β -1,2 s'effectue du côté non réducteur sur le carbone C2. Le rôle de l'ACP n'est pas clairement défini. Les acides aminés 1 à 50 semblent indispensables à la fonction de l'ACP dans la biosynthèse des OPG tout comme dans la biosynthèse des acides gras [Tang et coll., 1997]. Par contre, le groupement prosthétique de phosphopantéthéine n'est pas indispensable à la biosynthèse des OPG contrairement à la biosynthèse des acides gras [Therisod et coll., 1987]. Le cheminement de la biosynthèse des OPG n'apparaît pas similaire à la biosynthèse des acides gras. La fixation de l'ACP pourrait engendrer un changement de conformation d'un domaine actif de la protéine MdoH. Lors d'analyses des composés formant les OPG, des acides aminés (1 lysine, 3 acides glutamiques, 3 à 6 glycolles, 2 alanines et 3 prolines) ont été co-purifiés avec les OPG [Fiedler et coll., 1985] suggérant peut-être une forme d'OPG associée à une protéine.

Mais l'origine de ces acides aminés est inconnue et aucune relation avec les OPG n'a été mise en évidence.

L'hypothèse de nécessiter du bactoprénol pour servir d'accepteur et permettre la translocation des OPG de la face cytoplasmique vers la face périplasmique de la membrane cytoplasmique a fait l'objet de plusieurs études.

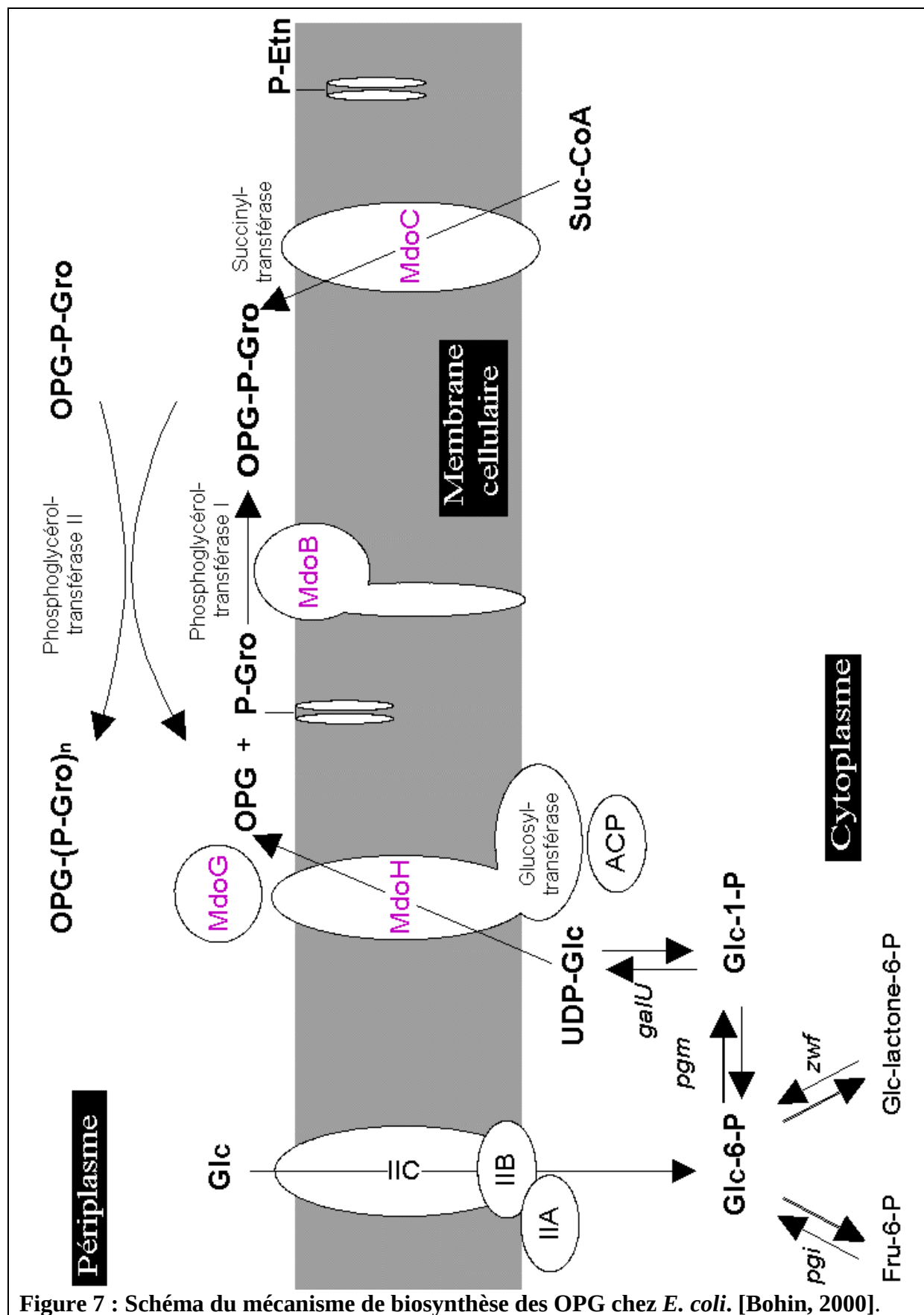


Figure 7 : Schéma du mécanisme de biosynthèse des OPG chez *E. coli*. [Bohin, 2000].

La colicine M interfère dans la régénération du bactoprénol phosphate et inhibe donc la biosynthèse du peptidoglycane [Holtje, 1998] et du LPS [Nikaido, 1996]. Par analogie, la biosynthèse des OPG a été mesurée en présence de colicine M. Aucune différence n'a été observée [Harkness et coll., 1990].

De même, Aucun intermédiaire polyprényl-P-glucose et polyprényl-P-P-glucose n'a pu être détecté lors du test *in vitro* [Weissborn et coll., 1991]. Weissborn et coll. n'excluent pas l'hypothèse d'une forme associée à la protéine MdoH indétectable dans le test effectué. Par contre, le dosage des OPG a été effectué à partir d'une souche portant un allèle mutant thermosensible du gène *rth* impliqué dans la synthèse du bactoprénol. Aucune différence n'a été observée dans la quantité d'OPG pour les souches sauvage et mutantes dans le gène *rth* que ce soit à 30°C ou à 42°C. L'ensemble de ces résultats ne suggère pas l'intervention du bactoprénol dans la biosynthèse des OPG.

La classification des glycosyltransférases a été établie selon les critères suivants : la nature de substrat donneur de sucre, et le type de réaction catalysée (inversion ou conservation de l'anométrie de la liaison du sucre activé) [IUBMB, 1992]. Les critères de similitude de séquence en acides aminés et la comparaison des amas hydrophobes (HCA Hydrophobic Cluster Analysis) ont été ajoutés pour classer les glycosyltransférases [Campbell et coll., 1997]. Les glycosyltransférases utilisent les sucres activés par un résidu de nucléotide diphosphate. Deux types de réactions sont catalysés par les glycosyltransférases. Le mécanisme d'inversion qui permet de synthétiser une liaison d'anométrie β à partir d'un NDP-glucoside d'anométrie α . Le mécanisme de rétention qui permet la formation d'une liaison d'anométrie α à partir d'un substrat NDP-sucres d'anométrie α . L'analyse par HCA des séquences des glycosyltransférases a montré l'existence de deux domaines A et B. Le domaine A est toujours présent et possède deux résidus d'acides aspartiques conservés. Le domaine B n'est pas présent dans toutes les glycosyltransférases et il ne possède qu'un seul résidu d'acide aspartique conservé [Saxena et coll., 1995].

La comparaison de séquence en acides aminés du domaine central de la protéine MdoH, réalisée par B. Henrissat, a révélé des caractéristiques communes avec les glycosyltransférases de type 2 (E.C.2.4.1-). Le domaine central de la protéine MdoH possède trois acides aspartiques conservés. Les acides aspartiques 285 et 346 appartiendraient au domaine A et l'acide aspartique 449 appartiendrait au domaine B. L'importance de ces acides aminés dans la biosynthèse des OPG sera étudiée dans ce travail.

Le gène *mdoG* code une protéine périplasmique de 56 kda indispensable à la

biosynthèse des OPG chez *E. coli*. La fonction de la protéine MdoG n'est pas déterminée. Sa nécessité dans la synthèse *in vivo* des OPG suggère une coopération forte et des interactions avec la protéine MdoH. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à sa fonction [Lacroix, 1991]. La protéine MdoG pourrait être nécessaire à la translocation des OPG à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'un canal formé par les segments transmembranaires de la protéine MdoH. La protéine MdoG pourrait être impliquée dans la synthèse des branches sur la chaîne linéaire en cours de synthèse par la protéine MdoH.

2) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille II.

Les gènes *ndvB* et *ndvA* identifiés chez *S. meliloti* [Stanfield et coll., 1988] sont représentatifs des gènes impliqués dans la biosynthèse du squelette glucosidique de la famille II. Le gène *ndvB* code une protéine transmembranaire de haut poids moléculaire (319 kDa). Seule 60% de la partie N-terminale de la protéine NdvB, qui n'est pas classée parmi les glycosyltransférases, est indispensable à la biosynthèse des OPG cycliques. Un test *in vitro* à partir de fractions membranaires non purifiées a permis la biosynthèse de glucanes cycliques à partir de l'UDP-glucose. Ce test a aussi révélé un intermédiaire glucosidique lié de manière covalente à une protéine de haut poids moléculaire (235 kDa) chez *S. meliloti* et *A. tumefaciens* [Geremia et coll., 1987] [Zorreguieta et coll., 1986]. Cette protéine de haut poids moléculaire associé au glucose est codée par le gène *chvB* d'*A. tumefaciens* homologue au gène *ndvB* de *S. meliloti*. Cette protéine de 235 kDa est responsable de la biosynthèse des glucanes. La protéine se situant en haut du gel, le poids apparent a probablement été sous estimé et cette protéine correspond probablement à NdvB (Masse calculée à 309 kDa). La protéine NdvB pourrait à la fois catalyser l'élongation de la chaîne de résidus de glucose liés en β -1,2 et permettre la cyclisation [Zorreguieta et coll., 1988].

Le gène *ndvA* code une protéine cytoplasmique de 67 kDa. La protéine NdvA possède des similitudes de séquence avec les transporteurs ABC. La plus grande similitude de séquence est identifiée avec la protéine HlyB impliquée dans la sécrétion de l'hémolysine par le système de type I. La protéine NdvA pourrait intervenir dans la sécrétion des glucanes dans le périplasme ou vers le milieu extracellulaire.

3) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille III.

Les gènes *ndvB* et *ndvC* présents chez *B. japonicum* sont représentatifs des gènes permettant la biosynthèse des OPG de la famille III. Ils ont été identifiés grâce à leur capacité de compléter la mutation *ndvB* de *S. meliloti* [Bhagwat et coll., 1999]. Les protéines

NdvB (102 kda) et NdvC (62 kda) sont probablement insérées dans la membrane cytoplasmique. L'inactivation du gène *ndvB* entraîne l'absence de biosynthèse des OPG. Par contre, l'inactivation du gène *ndvC* n'abolit pas la synthèse des OPG. La quantité d'OPG est identique, mais la structure est différente. Les OPG ne renferment que des liaisons β -1,3 au lieu de liaisons β -1,3 et β -1,6. La protéine NdvB de *B. japonicum* ne possède pas de similitudes de séquence avec la protéine NdvB de *S. meliloti*. Par contre, La protéine NdvB de *B. japonicum* appartient à la famille des glycosyltransférases de type 2 comme MdoH. La protéine NdvC montre de fortes similitudes de séquence avec des gènes de levure impliqués dans le métabolisme des glucanes. La protéine NdvB pourrait être impliquée dans la polymérisation de glucanes cycliques possédant des liaisons β -1,3 ; et la protéine NdvC pourrait catalyser la formation de liaisons β -1,6 en coopération avec la protéine NdvB par l'addition de nouveaux résidus de glucose ou par le réarrangement des molécules synthétisées par la protéine NdvB [Breedveld et coll., 1994].

4) Biosynthèse du squelette des OPG de la famille IV.

Les gènes de biosynthèse des OPG de type IV ont été identifiés chez *R. sphaeroïdes* [Cogez et coll., 2002]. Le génome de *R. sphaeroïdes* possède à la fois un gène *ndvB*, sur le chromosome 2, similaire aux gènes responsables de la biosynthèse des OPG de la famille II et les gènes similaires aux gènes *mdoGH*, sur le chromosome 1, responsables de biosynthèse des OPG de la famille I. L'inactivation du gène *ndvB* n'empêche pas la biosynthèse des OPG qui possèdent une structure identique à celle des OPG d'une souche sauvage. Le gène *ndvB* de *R. sphaeroïdes* n'intervient pas dans la biosynthèse des OPG de la famille de type IV. Le locus similaire aux gènes *mdoGH* a révélé la présence d'une ORF (Open Reading Frame) similaire au gène *mdoG* et une ORF similaire au gène *mdoH*. Ces deux ORF ont été nommées *opgG* et *opgH* respectivement. Une troisième ORF, située entre les gènes *opgG* et *opgH*, s'est révélée indispensable à la biosynthèse des OPG. Cette ORF, nommée *opgI*, ne montre aucune similitude avec les protéines des banques de données. La complémentation de la mutation *mdoH* chez *E. coli* par le gène *opgH* de *R. sphaeroïdes* a permis de synthétiser des OPG de structure linéaire semblables à ceux de l'espèce *E. coli*. La protéine OpgH pourrait catalyser la polymérisation d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 et la protéine OpgG catalyserait la cyclisation des molécules par la formation d'une liaison α -1,6. La fonction de la protéine OpgI n'est pas élucidée.

La protéine OpgI pourrait être impliquée directement dans l'activité de OpgH, assurer

le rôle de l'ACP ou être impliquée dans un couplage traductionnel entre les gènes *opgI* et *opgH* nécessaire à l'expression de *opgH* [Cogez et coll., 2002].

5) Les gènes impliqués dans la substitution des OPG.

Le premier gène impliqué dans la substitution des OPG concernait le transfert de résidus de phosphoglycérol des phosphatidylglycérols vers les OPG.

Ce gène a été nommé *mdoB* [Jackson et coll., 1984]. Deux activités de phosphoglycérol-transférases ont été identifiées. Une phosphoglycérol-transférase I transmembranaire catalyse le transfert d'un résidu de phosphoglycérol provenant du phosphatidylglycérol vers une molécule d'OPG en cours de biosynthèse. Elle est codée par le gène *mdoB*. Une activité phosphoglycérol-transférase II soluble a été mise en évidence antérieurement. Cette phosphoglycérol-transférase II permet le transfert d'un résidu de phosphoglycérol provenant d'une molécule d'OPG soluble vers une autre molécule d'OPG soluble [Goldberg et coll., 1981]. La caractérisation du gène responsable de cette activité a été effectuée dans ce travail. Chez *S. meliloti*, le gène *cgmB* code une protéine soluble responsable de la substitution des OPG cycliques par le phosphoglycérol. La protéine CgmB ne possède que très peu de similitude (17,5%) avec la protéine MdoB. La provenance des résidus de phosphoglycérol n'a été démontrée [Wang et coll., 1999].

Le gène *mdoC* est responsable de la substitution des OPG par des résidus de succinate chez *E. coli*. Le profil d'hydrophobie a prédit l'existence de 10 segments transmembranaires. La protéine MdoC catalyse le transfert d'un résidu de succinate à partir d'un substrat cytoplasmique sur les chaînes d'OPG en cours de biosynthèse. Le succinyl-CoA a été proposé comme substrat [Lacroix et coll., 1999]. Un gène *opgC* a été identifié chez *R. sphaeroïdes*. La protéine OpgC ne montre pas de similitude séquence avec la protéine MdoC d'*E. coli*. Mais le profil d'hydrophobie de la protéine OpgC a prédit 10 segments transmembranaires. L'inactivation du gène *opgC* entraîne une absence de résidu de succinate sur le squelette des OPG de *R. sphaeroïdes* [Cogez et coll., 2002].

6) Phylogénie des gènes de biosynthèse des OPG.

Les gènes de biosynthèse des OPG peuvent être divisés en trois classes. Les gènes de type *mdo* permettant la biosynthèse des OPG de la famille I et IV, les gènes de type *ndvAB* permettant la biosynthèse des OPG de la famille II et III et les gènes de type *ndvBC* synthétisant les OPG de la famille III.

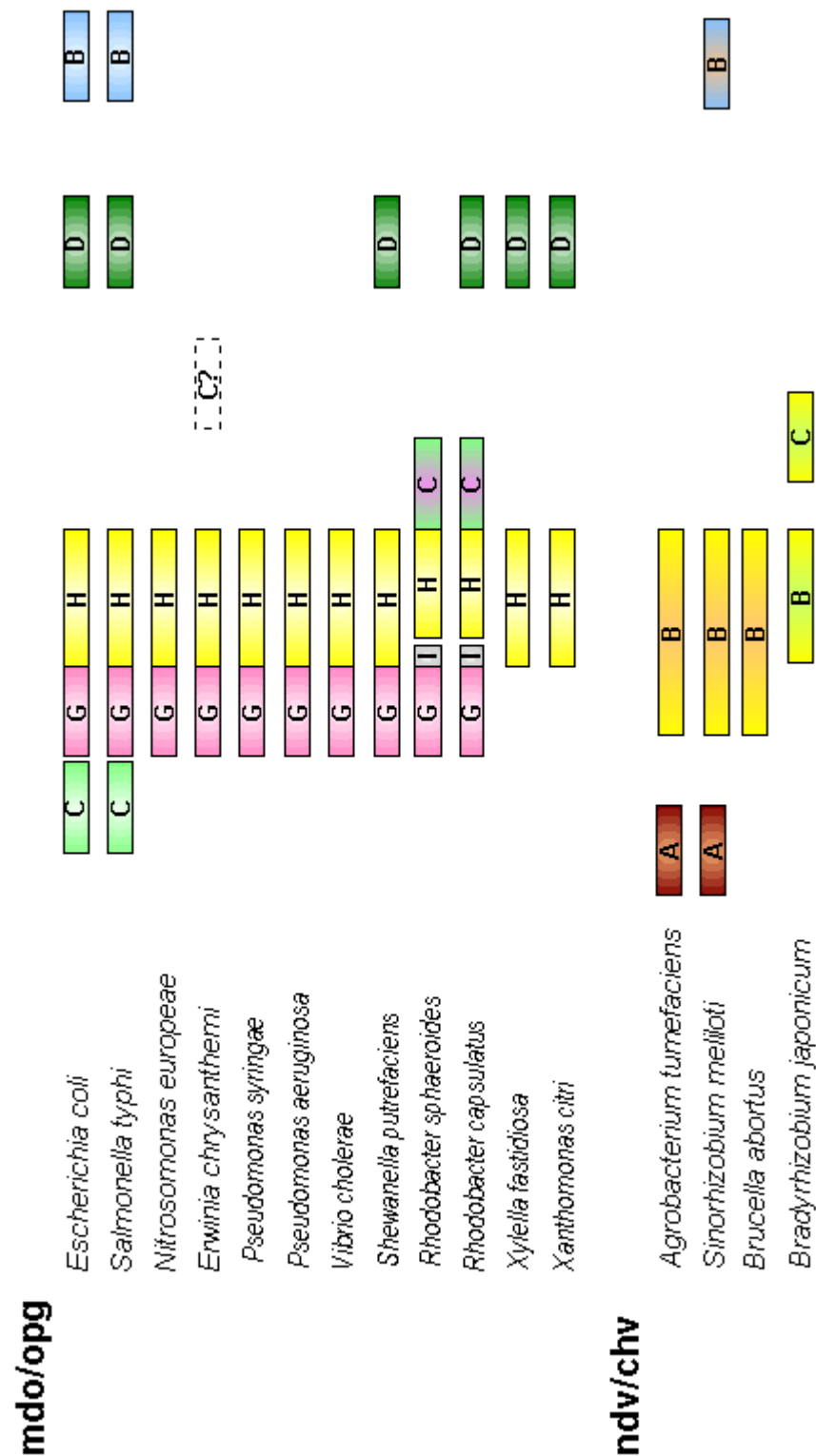


Figure 8 : Organisation génomique des gènes de biosynthèse des OPG.

La recherche systématique et régulière de gènes similaires révèle une large représentation des gènes de type *mdo* au sein des bactéries à Gram négatif (figure 8). Les gènes similaires au gène *ndvB* de *S. meliloti* sont identifiés chez *A. tumefaciens*, *S. fredii*, *B. abortus* et *A. brasilense*. L'organisation génomique des gènes *ndv* est relativement bien conservée chez ces espèces sauf pour *B. abortus* dont le gène similaire au gène *chvA* n'a pas été identifié. Tous ces gènes permettent la biosynthèse des OPG de la famille II, sauf pour *A. brasilense* qui synthétise des OPG de la famille III [Raina et coll., 1995].

Un locus *ndvB* a aussi été identifié chez *R. sphaeroïdes*, mais il ne participe pas à la biosynthèse des OPG identifiés comme appartenant à la famille IV [Cogez et coll., 2002].

Les gènes de type *mdoGH* sont donc les gènes les plus représentés. L'organisation génomique est relativement bien conservée au niveau des gènes de type *mdoG* et *mdoH* mais des différences significatives ont été mises en évidence.

Le gène *mdoH* est présent chez toutes ces espèces qui renferment des gènes de type *mdoGH*. La similitude de séquence entre la protéine MdoH de *E. coli* et des orthologues peut aller de 94% chez *Salmonella typhi* à 22% chez *Vibrio cholerae*.

Le gène *mdoG*, quant à lui, n'est pas présent chez toutes ces espèces. La similitude de séquence peut aller de 96% chez *S. typhi* à 32% chez *V. cholerae*. Trois organisations génomiques sont identifiées (figure 8). Dans la première organisation, les gènes *mdoG* et *mdoH* sont organisés en opéron dans cet ordre. En plus de ces deux gènes indispensables à la biosynthèse du squelette glucosidique, un troisième gène *mdoD*, dont l'implication dans la biosynthèse des OPG a été étudiée dans ce travail, a été détecté chez les entérobactéries et *Shewanella putrefaciens*. Les gènes *mdoG* et *mdoD* sont des gènes paralogues. Le gène *mdoD* est localisé dans une région chromosomique différente du locus *mdoGH*. Dans l'état actuel des connaissances, l'organisation des gènes *mdoGH* en opéron est présente uniquement chez les espèces synthétisant des OPG de la famille I.

La seconde organisation est représentée sur le génome de *R. sphaeroïdes* [Cogez et coll., 2002]. Les gènes *opgG* et *opgH* sont aussi organisés en opéron mais une ORF supplémentaire (*opgI*) est intercalée entre ces deux gènes (figure 8). Cette organisation de trois gènes en opéron *opgGIH* est identifiée chez *R. sphaeroïdes* et *R. capsulatus*. Les gènes *opgGIH* sont indispensables à la biosynthèse des OPG de la famille IV. Le gène *opgD* similaire à *mdoD* est présent chez *R. capsulatus* à un locus différent de *opgGIH*. Les génomes des autres espèces de *Rhodobacter* étant incomplets, la présence du gène *opgD* ne peut être affirmée.

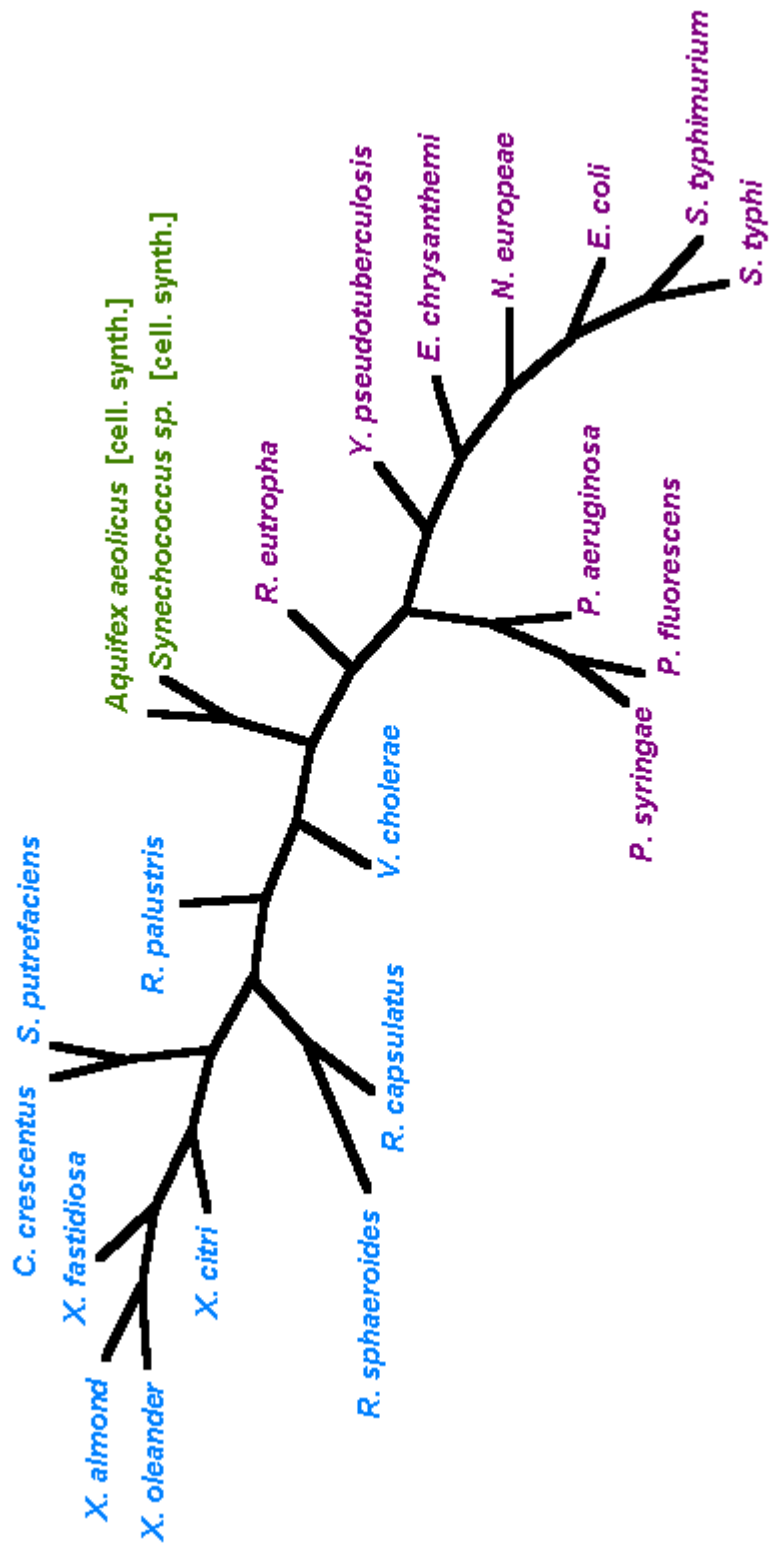


Figure 9a : Arbre phylogénétique des gènes *opgH* chez les Protéobactéries.

Une troisième organisation est représentée sur le génome de *Xylella fastidiosa*. L'organisation montre l'absence du gène *opgG* en amont du gène *opgH* et la présence du gène *opgD* situé à un locus distinct de *opgH*. La protéine OpgH seule semble pouvoir synthétiser des OPG *in vivo* [Bôas vilas L., communication personnelle]. L'absence du gène *opgG* est relevée chez *X. almond* et *X. oleander*. Dans l'actuel des connaissances, le gène *opgD* est aussi identifié chez les espèces *X. fastidiosa* et *Xanthomonas citri* [Talaga et coll., 1996], même si ces deux espèces synthétisent respectivement des OPG de la famille I et IV.

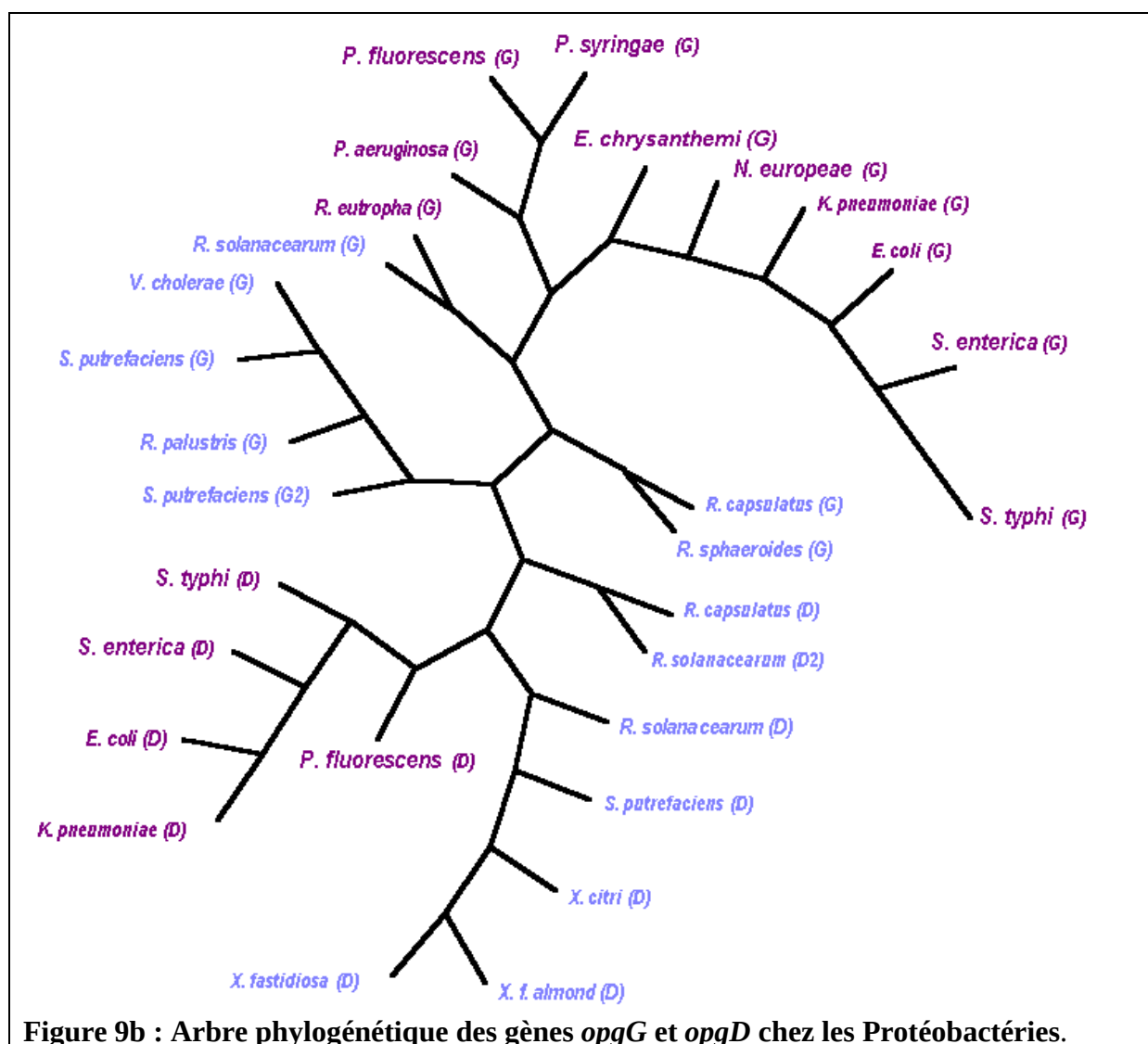


Figure 9b : Arbre phylogénétique des gènes *opgG* et *opgD* chez les Protéobactéries.

L'arbre phylogénétique (figure 9a) créé avec les séquences des protéines similaires à MdoH montre deux branches principales qui séparent d'un côté l'organisation en opéron des gènes *opgGH* relevée dans le génome de *E. coli* (*mdoGH*) et de l'autre les deux organisations identifiées dans le génome de *R. sphaeroides* (*opgGIH*) et celui de *X. fastidiosa* (*opgH*). Seul

S. putrefaciens (*opgGH*) et *C. crescentus*, dont l'organisation génomique est identique à celle de *E. coli*, se trouvent dans la deuxième branche. Dans cette deuxième branche, un groupe condensé renferme les espèces avec une organisation identique à celle du génome de *X. fastidiosa* et un autre groupe relativement étalé renferme les espèces avec une organisation identifiée dans le génome de *R. sphaeroïdes*.

L'arbre phylogénétique créé avec les séquences des protéines OpgG et OpgG (figure 9b) révèle une partie supérieure renfermant les protéines MdoG et une partie inférieure renfermant les protéines OpgD. Chacune de ces deux branches renferme une organisation semblable à celle trouvée sur l'arbre créé avec les protéines OpgH. Néanmoins une séparation floue entre les protéines OpgG et OpgD est trouvée chez les espèces *Rhodobacter*, *V. cholerae*, *R. solanacearum* et *S. putrefaciens*. De plus, une duplication des gènes *opgD* et *opgG* est trouvée respectivement chez *R. solanacearum* et *S. putrefaciens*. Dans l'actuel des connaissances, il n'est possible de déterminer si ces gènes s'expriment ou si cette duplication n'est pas le fait d'une erreur dans l'analyse de leur génome.

L'organisation génomique ne reflète pas le type d'OPG synthétisés. La protéine MdoH semble tout de même spécifique de la biosynthèse de liaisons β -1,2. La cyclisation ou la ramification serait effectuée par la protéine *mdoG* et/ou la protéine *mdoD* selon les cas.

III) Régulation de la biosynthèse des OPG.

La biosynthèse des OPG apparaît soumise à une régulation osmotique chez les Protéobactéries. La quantité d'OPG accumulée dans le périplasme augmente d'autant plus que l'osmolarité du milieu diminue. A basse osmolarité (0,1osM ou en dessous), la quantité d'OPG peut atteindre une proportion conséquente du poids sec de la cellule allant jusqu'à 5%. A haute osmolarité (au-dessus de 0,6 osM), la quantité d'OPG accumulés dans le périplasme chute en dessous de 0,5% du poids sec de la cellule. Cette régulation de l'accumulation des OPG suivant la variation de l'osmolarité du milieu est plus ou moins prononcée suivant les espèces bactériennes exceptés chez *B. abortus* et *S. meliloti* GR4 [Lacroix et coll., 1999] [Breedveld et coll., 1994]. Lors d'un changement brutal vers des milieux de haute osmolarité, la biosynthèse des OPG est rapidement bloquée, mais les OPG ne sont pas dégradés. Plusieurs générations sont donc nécessaires pour ajuster la concentration des OPG grâce à la dilution du périplasme engendrée par les divisions cellulaires. Ce phénomène est observé à la fois chez *E. coli* et *S. meliloti*. De plus, au moins une génération est nécessaire pour atteindre le niveau d'OPG maximum lors d'une diminution brutale de l'osmolarité chez *E. coli* [Lacroix, 1989b]

La régulation de l'activité de biosynthèse des OPG semble s'effectuée au niveau

transcriptionnelle et ou enzymatique suivant les espèces.

1) Régulation enzymatique.

L'activité de biosynthèse de la glucosyl-transférase a été mesurée à l'aide d'extraits membranaires de l'espèce *E. coli* [Rumley et coll., 1992] et de *S. meliloti* [Zorreguieta et coll., 1990] dans différentes conditions d'osmolarité. Deux types de composés, ioniques (K^+ , NaCl) ou neutres (saccharose, mannitol), ont été ajoutés pour faire varier l'osmolarité lors de tests *in vitro* de l'activité de biosynthèse de la glucosyl-transférase. La biosynthèse des glucanes *in vitro* est inhibée de manière significative en présence des composés ioniques tels que le K^+ et NaCl. Par contre, les composés neutres n'engendrent pas ou ont un effet moindre sur l'activité de biosynthèse de la glucosyl-transférase. Ce phénomène est identifié lors des tests *in vitro* effectués avec les extraits membranaires de *E. coli* et de *S. meliloti*. L'activité de biosynthèse apparaît régulée au niveau enzymatique. Cette régulation semble dépendre *in vitro* de la force ionique plus que de l'osmolarité. Les ions K^+ , dont la concentration devient très importante à haute osmolarité dans le cytoplasme, pourraient avoir un rôle primordial dans cette régulation osmotique au niveau de l'activité enzymatique de la glucosyl-transférase *in vivo*.

La substitution des OPG par le phosphoglycérol semble être aussi osmorégulée au niveau enzymatique pour la protéine CgmB de *S. meliloti* [Breedveld et coll., 1995]. L'homologue de fonction MdoB chez *E. coli* ne semble pas être régulé par l'osmolarité au niveau de son activité enzymatique [Bohin et coll., 1984a]. De plus, les OPG extraits de cellules DF214 d'*E. coli* cultivées à haute ou basse osmolarité ne montrent pas de différence dans leur caractère anionique (voir résultats partie 3). Par contre, La substitution des OPG par des résidus de succinate chez *E. chrysanthemi* diminue quand l'osmolarité du milieu augmente [Cogez et coll., 2001]. Le mode de régulation est à ce jour inconnu.

2) Régulation transcriptionnelle.

L'analyse de l'activité d'une fusion traductionnelle entre l'opéron *mdoGH* et le gène *lacZ* (*mdoGH::lacZ*) et la mesure du taux d'ARNm de l'opéron *mdoGH* chez *E. coli* a permis de révéler une régulation osmotique de l'expression de l'opéron identique à la régulation osmotique observée au niveau de la biosynthèse des OPG [Lacroix et coll., 1991]. Cette régulation osmotique est indépendante de la concentration des OPG dans le périplasme. La transcription de l'opéron apparaît être régulée en fonction de l'osmolarité.

De plus, l'opéron fait partie du régulon σ^E . σ^E est un facteur de transcription impliqué dans la réponse initiée par la présence de protéines mal conformées de l'enveloppe

[Dartigalongue et coll., 2001a]. L'implication des OPG dans la réponse initiée par la présence de protéines mal conformées n'a pas encore été démontrée, mais les OPG pourraient interagir avec les phospholipides ou les protéines de l'enveloppe pour limiter les dommages causés par le stress thermique. Chez *A. tumefaciens*, des extraits membranaires de cellules cultivées à haute osmolarité ont montré une diminution de 20% à 50% de l'activité de synthèse des glucanes par rapport à des extraits membranaires de cellules cultivées à basse osmolarité. Ces résultats montrent une régulation osmotique du gène *chvB* qui est toute fois inférieure à la répression de la biosynthèse des OPG observée *in vivo* à haute osmolarité (85%) [Zorreguieta et coll., 1990]. Par contre, des extraits membranaires des bactéries *S. meliloti* obtenus à partir de cellules cultivées à haute ou basse osmolarité catalysent des quantités équivalentes de glucanes [Breedveld et coll., 1992].

La régulation de la substitution par le phosphoglycérol a aussi été observée chez *S. meliloti*. Une régulation osmotique de la substitution par le phosphoglycérol a tout d'abord été identifiée au niveau enzymatique en absence de synthèse de protéine [Breedveld et coll., 1995]. Mais une régulation transcriptionnelle du gène *cgmB* responsable de la substitution des OPG par des résidus de phosphoglycérol a été démontrée par extension d'amorce. La substitution des OPG par le phosphoglycérol semble être régulée au niveau enzymatique et transcriptionnel [Wang et coll., 1999].

Les tests d'activité enzymatique *in vitro* ont montré leurs limites dans ces expériences. Ils ne traduisent probablement pas tous les éléments et les conditions présentes *in vivo*. Il semblerait que l'activité de la biosynthèse des OPG soit régulée à la fois au niveau enzymatique et au niveau génétique. La régulation enzymatique pourrait expliquer la rapide inhibition de biosynthèse des OPG lors d'une augmentation brutale de l'osmolarité qui influence fortement la concentration des ions cytoplasmiques (K^+) responsables de l'inhibition *in vitro* de l'activité de biosynthèse sous le contrôle la protéine MdoH. La régulation génétique prendrait le relais avec un temps de latence pour une adaptation de longue durée face à une variation de l'osmolarité du milieu.

3) Régulation par la concentration des OPG.

L'inhibition de la biosynthèse des OPG par leur concentration périplasmique a été démontrée à l'aide de la souche DF214 (*pgi*, *zwf*) qui est incapable de synthétiser des OPG en absence de glucose exogène. Après l'addition de glucose, les OPG sont accumulés rapidement pour atteindre un plateau correspondant à la concentration des OPG identifiés dans une souche sauvage. Cette inhibition par la concentration des OPG périplasmiques est

indépendante de l'osmolarité [Rumley et coll., 1992]. Des conclusions semblables ont été déduites lors d'études de la biosynthèse des OPG chez *Rhizobium leguminosarum*. L'inhibition de la synthèse des glucanes *in vitro* s'effectue à des concentrations identiques à celles identifiées dans le périplasma [Breedveld et coll., 1992]. L'inhibition de biosynthèse par la concentration des OPG périplasmiques pourrait s'effectuer soit directement sur le complexe enzymatique MdoGH ou par l'intermédiaire d'un système capteur/régulateur impliqué dans la régulation transcriptionnelle des gènes responsables de la biosynthèse des OPG. L'inhibition de biosynthèse des OPG par leur concentration périplasmique pourrait expliquer la chute brutale de l'activité de biosynthèse des OPG deux heures après l'entrée en phase stationnaire [Lacroix, 1989b]. Cette inhibition pourrait s'effectuer à la fois au niveau enzymatique pour une réponse rapide et au niveau génétique pour une réponse à long terme face aux variations des conditions environnementales.

La régulation de la biosynthèse des OPG semble s'effectuer au niveau transcriptionnel et/ou enzymatique. Cette régulation des OPG doit probablement être intégrée dans un ou des systèmes de régulation globale induit par les conditions du milieu et parfois de manières différentes suivant les espèces considérées.

IV) Implication des OPG dans la physiologie cellulaire.

1) Phénotypes associés à l'altération des OPG.

Différents mutants de gènes impliqués dans la biosynthèse des OPG au niveau du squelette glucosidique ou de la substitution ont été obtenus chez des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux ou les végétaux. Les phénotypes observés sont pléiotropes et peuvent différer d'une espèce à l'autre, mais ils sont toujours en relation avec des constituants de l'enveloppe ou des protéines sécrétées. Ces altérations dans la structure et/ou des fonctions de l'enveloppe provoquent de fortes déficiences dans la virulence des bactéries vis-à-vis des cellules hôtes.

Que ce soit chez les Rhizobiacées, chez *E. chrysanthemi* ou chez *E. coli*, les colonies des mutants affectés dans la biosynthèse du squelette glucosidique des OPG montrent un phénotype muqueux provoqué par une hyperproduction d'EPS [Ebel et coll., 1997] [Page et coll., 2001] [Breedveld et coll., 1994]. Chez *E. coli*, les mutants *mdoGH* empêchent l'expression de la protéine de lyse MS2 [Holtje et coll., 1988]. L'absence d'OPG entraîne une diminution importante de la motilité et un déficit dans le chimiotactisme quelles que soient les espèces. Ce phénotype est probablement dû à un déficit du nombre de flagelles [Fiedler et

coll., 1988].

Les mutants *ndv* de *S. meliloti* et *chv* de *A. tumefaciens* sont incapables de croître dans des milieux hypo-osmotiques. Par contre des mutants *mdoGH* d'*E. coli* et *opgGH* d'*E. chrysanthemi* sont tout à fait capables de croître normalement dans un milieu hypo-osmotique. Des mutants *opgGH* d'*E. chrysanthemi* sont hypersensibles aux sels biliars alors que les mutants *mdoGH* d'*E. coli* ne le sont pas [Page et coll., 2001].

L'altération de certaines fonctions de l'enveloppe altère les interactions chez de nombreuses espèces avec les cellules hôtes entraînant une absence de virulence ou de symbiose.

L'étude du locus *hrp* impliqué dans la virulence des bactéries de l'espèce *P. syringae* a permis de caractériser l'ORF1 homologue au gène *mdoG* et l'ORF2 homologue au gène *mdoH* et appelé *hrpM*. L'inactivation d'un des deux gènes entraîne la non virulence des bactéries vis-à-vis des plantes de haricots et n'entraîne pas de réaction d'hypersensibilité chez la plante de tabac [Mukhopadhyay et coll., 1988]. Chez *S. meliloti*, les mutants *ndvB* et *ndvA* forment des pseudo-nodules incapables de fixer l'azote chez les Légumineuses. Ces pseudo-nodules renferment un petit nombre de cordons d'infection incapables de fixer l'azote. La présence de ces cordons d'infection montre que les OPG pourraient être impliqués dans le développement de ces cordons d'infection et non dans l'interaction avec les cellules hôtes. Chez *A. tumefaciens*, les mutants *chvB* et *chvA* sont non virulents [Douglas et coll., 1985]. Les souches *chv* sont incapables de se développer sur les plantes hôtes. L'absence d'OPG engendre une altération dans l'enveloppe et/ou dans la sécrétion de facteurs de virulence. *B. japonicum* est une bactérie symbiotique. L'inactivation du gène *ndvB* (responsable de synthèse des OPG de la famille III) entraîne la formation de pseudo-nodules incapables de fixer l'azote. L'inactivation du gène *ndvC* entraîne la biosynthèse d'OPG constitués uniquement de liaisons β -1,3. Le mutant *ndvC*, contrairement au mutant *ndvB*, est doué de motilité, et croît à basse osmolarité, par contre celui-ci forme des nodules incapables de fixer l'azote [Bhagwat et coll., 1999]. Les inactivations des gènes *opgG* et *opgH* chez *E. chrysanthemi* entraînent l'incapacité de générer la macération des tubercules de pomme de terre ou des feuilles d'endives [Page et coll., 2001]. La co-inoculation de bactéries *opg* avec des bactéries sauvages ne permet la croissance des bactéries mutantes de l'espèce *E. chrysanthemi*. Ces résultats montrent une nécessité des OPG périplasmiques pour la croissance des bactéries dans les plantes et ne semblent pas être expliqués uniquement par la diminution de la sécrétion des exo-enzymes.

L'importance des OPG dans le mécanisme de virulence a aussi été mise en évidence pour des bactéries infectant des organismes du règne animal.

Des mutations aléatoires par insertion de transposon ont été criblées par la mesure de la dose létale à 50% (DL₅₀) de *S. typhimurium* chez la souris. Parmi ces mutants, le transposon MuJ a été localisé dans le gène *mdoB* responsable de la substitution des OPG par le phosphoglycérol. Ce mutant présente une DL₅₀ 1000 fois supérieure à celle d'une souche sauvage [Bowe et coll., 1998]. De plus, ce mutant garde un caractère immunogène comparable au mutant *aroA* faisant partie des souches efficaces pour une vaccination [Valentine et coll., 1998]. Le criblage de mutants par insertion de transposon dans la souche *P. aeruginosa* PA-14 a été effectué par des tests de virulence. La souche PA-14 est capable d'infecter *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* et la souris. 7 insertions ont provoqué une incapacité à tuer *C. elegans*. Parmi ces 7 mutants, une insertion a été localisée dans le gène *hrpM* homologue du gène *mdoH*. Ce mutant *hrpM* est aussi incapable d'induire la mort chez la souris et d'infecter *A. thaliana* [Mahajan-Miklos et coll., 1999].

Ces résultats montrent l'importance des OPG dans le développement des bactéries chez les animaux et les plantes. Des mécanismes communs, dont les OPG semblent être un élément important, doivent être impliqués dans la virulence ou la symbiose des bactéries.

2) Interactions des OPG avec leur Environnement.

Des études ont montré que des sucres (le glucose, le tréhalose) et le glycérol pouvaient interagir avec les phospholipides en déplaçant des molécules d'eau. Ces interactions sucres-phospholipides ou glycérol-phospholipides modifient les propriétés physiques des phospholipides influençant la fluidité de la membrane [Tsvetkova et coll., 1998]. Les OPG qui renferment toujours des résidus de glucose et parfois des résidus de glycérol pourraient interagir avec les phospholipides et modifier les propriétés physiques des membranes.

Des tests *in vitro* ont montré que l'ajout d'OPG dans un mélange contenant des extraits de membrane externe permettait de favoriser la fermeture des canaux formés par les porines [Delcour et coll., 1992]. Cet effet des OPG sur la fermeture des porines a été observé uniquement lorsqu'une différence de potentiel inverse au potentiel de Donnan a été appliquée aux extraits de membrane externe. Cette diminution de la conductance suggère des interactions au niveau des porines et/ou dans les canaux formés, empêchant l'accès des solutés. Ainsi, lors d'un passage brutal d'un milieu de basse à haute osmolarité, les porines étant préférentiellement fermées, l'entrée trop massive de molécules chargées serait diminuée.

La diminution de la concentration des OPG au fur et à mesure des générations permettrait une entrée progressive des ions. D'autres molécules comme la phosphoéthanolamine sont aussi capables d'engendrer la fermeture des porines. La perméabilité de la membrane externe doit probablement être régulée par plusieurs types de composés et permettre une réponse rapide face à un changement des conditions extérieures. Les OPG semblent être intégrés dans ce système de régulation de la perméabilité de la membrane externe [Delcour et coll., 1992]. La sécrétion de la ricadhésine est altérée chez les Rhizobiacées dans un contexte *ndv*. Dans un milieu hypo-osmotique, l'insertion correcte de la ricadhésine dans l'enveloppe pourrait être dépendante de la présence des OPG périplasmiques [Swart et coll., 1993]. Ces influences des OPG peuvent se faire soit au niveau des protéines ou de la structure de l'enveloppe.

La présence des OPG influence aussi la régulation transcriptionnelle de gènes. Dans une souche mutante *mdoH*, la proportion de la porine OmpC est augmentée et celle de OmpF est diminuée. Ce phénomène est inverse à celui observé à haute osmolarité [Fiedler et coll., 1988]. Une mutation suppressive du phénotype *mdo* a été localisée dans le locus *ompB* (*envZ/ompR*). La présence des OPG à faible osmolarité pourrait être un signal reconnu par le capteur EnvZ et permettre une modulation de l'expression des gènes *ompC* et *ompF* par l'intermédiaire de OmpR. D'autres analyses ont montré que cette régulation s'effectue à de très basse osmolarité. L'ajout d'une petite quantité d'ions (KCl 15 mM) découple la régulation des gènes de porines vis-à-vis de la présence des OPG. L'influence des OPG sur l'expression des gènes de porines ne semble se réaliser qu'à faible osmolarité [Geiger et coll., 1992].

La motilité des bactéries *opg⁻* se voit réduite. Des observations microscopiques ont montré une diminution du nombre de flagelles insérés dans la membrane. L'opéron *flhDC* majeur pour la synthèse des flagelles est régulé en partie par le système EnvZ/OmpR. La modulation de l'activité de EnvZ à basse osmolarité par les OPG pourrait expliquer la diminution du nombre de flagelles. L'hypothèse des OPG comme signal de la basse osmolarité reconnu par un capteur membranaire a été aussi suggérée dans la régulation de l'expression de l'acide colanique. Des mutants montrent un phénotype muqueux chez les bactéries pathogènes pour les animaux et les plantes provoqué par la surexpression des exopolysaccharides et notamment de l'acide colanique. De plus, l'effet des OPG sur l'expression de l'acide colanique requiert les gènes *rcsB*, *rcsC* et *rcsA*. A basse osmolarité, la forte concentration des OPG périplasmiques serait captée par le capteur membranaire RcsB entraînant la répression des gènes *cps* (gènes de synthèse de l'acide colanique) par

l'intermédiaire de RcsC [Ebel et coll., 1997].

Une régulation dépendant des OPG chez *E. chrysanthemi* est soupçonnée pour l'expression des enzymes nécessaires à la macération des tissus végétaux. La sécrétion des pectinases, impliquées dans la dégradation de la paroi végétale, est diminuée d'un facteur deux dans un mutant *opgGH*. La même diminution est observée au niveau de l'expression de gènes de pectinases (*pelE* et *pelC*). La présence des OPG dans le périplasme pourrait être un signal pour un système capteur/régulateur [Page et coll., 2001]. De plus, une diminution de l'expression du gène *outC* qui code une protéine du système de sécrétion de type II sécrétant les pectinases, les cellulases et les protéases a été observée chez *E. chrysanthemi*. Il en résulte une diminution de la sécrétion des pectinases, des cellulases et des protéases [Page et coll., 2001].

Une souche *ndv* exacerbe l'instabilité de la protéine VirB10 à température élevée chez *A. tumefaciens* [Banta et coll., 1998]. La stabilité de la protéine VirB10, impliquée dans le système de sécrétion de l'ADN-T et la piline T, est influencée par les OPG. Ces résultats suggèrent que les OPG aient une influence sur la stabilité des systèmes de sécrétion soit de manière directe en interagissant avec les protéines soit en modifiant des propriétés physiques la membrane qui influencent la stabilité de ces systèmes de sécrétion.

Chez les Rhizobiacées, les OPG peuvent être sécrétés en grande quantité dans le milieu extérieur. Le rôle de ces OPG sécrétés reste ambigu puisque les résultats sont différents d'une espèce à une autre. Chez *B. japonicum*, Les OPG de la famille III possèdent une affinité pour un récepteur non identifié sur les plantes de soja [Bhagwat et coll., 1999]. Chez *S. meliloti*, l'ajout d'OPG à un inoculum de souche *ndvB* ne permet pas la formation de nodules efficaces. Par contre, si les OPG sont ajoutés à un inoculum de souche sauvage de *S. meliloti*, la formation de nodules est favorisée [Dylan et coll., 1990a]. La formation de nodules pourrait emprunter des chemins légèrement distincts pour les espèces bactériennes données et ou selon les plantes hôtes données. L'ajout d'OPG à un inoculum d'une souche *chv* de *A. tumefaciens* ne permet pas le développement des bactéries dans la plante. Un co-inoculum de la souche *opg* et *opg*⁺ de *E. chrysanthemi* ne permet pas la croissance des bactéries *opg*⁻ dans la plante. Chez les bactéries pathogènes pour les plantes, la virulence ne paraît pas dépendre des OPG sécrétés contrairement aux OPG périplasmiques indispensable à l'infection des tissus.

3) Hypothèses sur les Fonctions des OPG.

Les OPG possèdent des structures variables d'une espèce à l'autre. Malgré cette variabilité dans la structure, des complémentations hétérologues ont permis de restaurer les fonctions de motilité, la capacité de croître à basse osmolarité ainsi que la symbiose chez les Rhizobiacées. La capacité de croître à basse osmolarité et de symbiose d'une souche *S. meliloti ndvB* (OPG de la famille II) peut être rétablie grâce au locus *ndv* (OPG de la famille III) de l'espèce virulente *B. japonicum* [Bhagwat et coll., 1993] ou à un cosmide permettant la synthèse d'OPG hybrides (liaisons β -1,3) [Pfeffer et coll., 1996]. La structure du squelette glucosidique ne semble pas influencer la fonction des OPG.

De même, la structure du squelette ne permet pas une spécification d'hôte. Une souche *S. meliloti* et *R. fredii* synthétisent des OPG semblables, mais possèdent des hôtes différents : les plantes de soja pour *R. fredii* et la luzerne pour *S. meliloti* [Breedveld et coll., 1994]. *B. japonicum* possède le même hôte que *R. fredii* mais synthétise des OPG différents [Bhagwat et coll., 1995]. De plus, des études ont montré que la spécification d'hôte est en majorité sous le contrôle des facteurs de nodulation (Nod) [Dénarié et coll., 1996]

L'influence de la substitution sur la fonction des OPG est difficile à définir puisque la nature, le taux de substitution et la présence de substituants varient considérablement d'une espèce à l'autre. L'importance éventuelle des substituants n'a pu être observée que chez *S. typhimurium* où l'inactivation du gène *mdoB* engendre une atténuation de la virulence des bactéries vis-à-vis des souris [Bowe et coll., 1998]. L'implication du caractère anionique du phosphoglycérol des OPG n'a pas été démontrée.

La première hypothèse formulée de la fonction des OPG a été un rôle osmoprotecteur. Cette hypothèse était basée sur le caractère anionique des OPG qui aurait permis de garder en équilibre le potentiel de Donnan. Mais certains OPG ne possèdent pas de substituant anionique. Cayley et coll. ont proposé que la concentration en OPG puisse réguler le volume du périplasme à basse osmolarité [Cayley et coll., 2000]. Mais cette hypothèse se base aussi sur la contribution du caractère anionique des OPG. Par conséquent, ces fonctions ne peuvent être communes à tous les OPG. Par contre, il est possible que les OPG possédant un caractère anionique puissent participer au maintien du potentiel de Donnan en coopération avec d'autres éléments du périplasme. De même, la fonction des OPG sécrétés n'est pas partagée par toutes les espèces. A ce jour seul les OPG de *B. japonicum* semblent avoir un récepteur situé sur les plantes hôtes. Chez les autres espèces, la co-inoculation de bactéries sauvages

avec des bactéries mutantes ou l'ajout d'OPG à un inoculum de bactéries incapables de synthétiser des OPG ne permet pas de rétablir la croissance des bactéries mutantes dans les cellules hôtes.

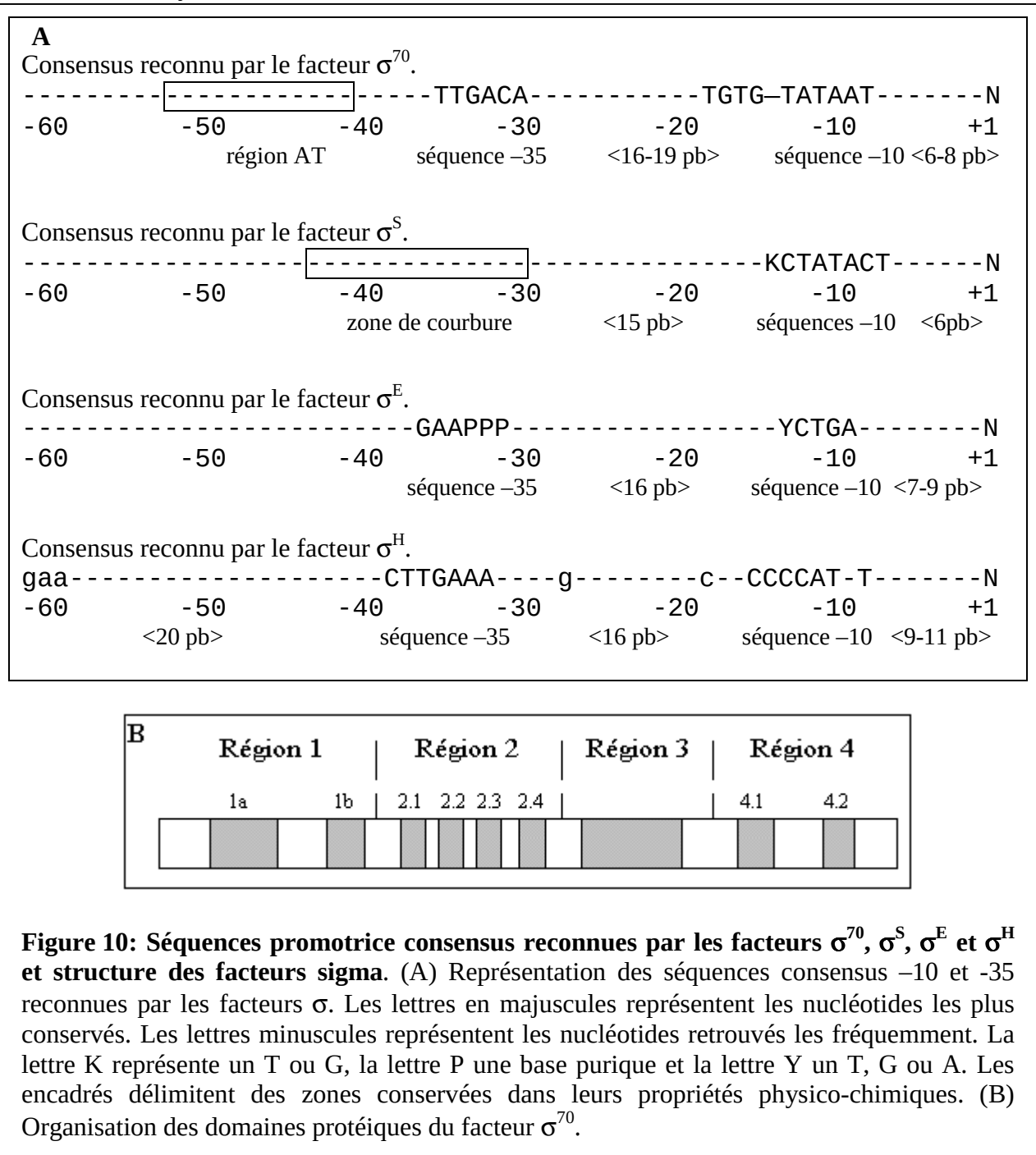
L'absence des OPG provoque la perte de la motilité, une sensibilisation aux milieux de basse osmolarité et surtout une perte de la capacité de croissance dans les organismes animaux ou végétaux. Des pseudorévertants pour la motilité chez une souche *S. meliloti ndvB* sont incapables de former des nodules efficaces. Inversement, des pseudorévertants pour la symbiose d'une souche *S. meliloti* sont incapables de nager [Dylan et coll., 1990b]. Ceci montre que les fonctions de motilité et de symbiose font appel à des mécanismes distincts mais partagent aussi des mécanismes communs qui sont tous deux dépendants de la présence des OPG dans le périplasme.

Les OPG pourrait interagir avec les composés de l'enveloppe comme les phospholipides, le peptidoglycane ou des protéines périplasmiques et membranaires. Ces interactions favoriseraient une conformation optimale de l'enveloppe à basse osmolarité.

C) Les facteurs sigma alternatifs chez *E.coli*.

La transcription est réalisée grâce au complexe ARN-polymérase formé de deux sous-unités α , d'une sous-unité β et d'une sous-unité β' . Ce complexe $\alpha_2\beta\beta'$ forme le noyau de l'ARN-polymérase. L'initiation de la transcription nécessite une sous-unité supplémentaire appelée sigma (σ). Le complexe $\sigma\alpha_2\beta\beta'$ forme l'holoenzyme. Le facteur σ confère la spécificité de reconnaissance des promoteurs par l'holoenzyme $\sigma\alpha_2\beta\beta'$. Plusieurs facteurs σ sont synthétisés par la bactérie à différents moments de la phase de croissance et selon les conditions du milieu. Le facteur majoritaire est le facteur σ^D (σ^{70}) qui permet l'initiation de la transcription des gènes impliqués dans les fonctions fondamentales de la cellule [Record et coll., 1996]. D'autres facteurs alternatifs coordonnent l'expression de régulon. Le σ^N régule les gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote, le σ^F régule les gènes impliqués dans la synthèse du flagelle, le σ^{19} régule les gènes impliqués dans le transport du fer, le σ^S est spécifique des gènes transcrits en phase stationnaire et lors de divers stress (hyper-osmotique, thermique, privation de carbone...), le σ^H (32) et le σ^E sont respectivement spécifiques des gènes induits lors de la présence de protéines mal conformées dans le cytoplasme et dans l'enveloppe. Quels que soient les facteurs sigma, l'initiation de la transcription s'effectue en plusieurs étapes. L'holoenzyme $\sigma\alpha_2\beta\beta'$ reconnaît le promoteur et se fixe sur l'ADN pour

former un complexe binaire fermé. Puis les deux brins d'ADN se déshybrident au niveau du point d'initiation de la transcription pour former le complexe ouvert. En présence de quatre nucléotides triphosphates, le complexe s'engage dans un processus de transcription abortive et commence la synthèse d'un ARNm.



La transcription se poursuit quand l'holoenzyme s'éloigne du promoteur en entraînant un changement de sa conformation et la libération du facteur σ . Le noyau $\alpha_2\beta\beta'$ s'engage alors dans un processus d'élongation d'un brin ARNm [Rojo, 1999].

La description des facteurs σ sera limitée aux facteurs σ^{70} , σ^S , σ^E et σ^H dont l'implication dans la biosynthèse des OPG a été démontrée ou est prédite.

I) Description des promoteurs.

Chaque facteur σ reconnaît des séquences consensus plus ou moins éloignées l'une de l'autre permettant de spécifier l'expression de gènes par un ou plusieurs facteur sigma.

1) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^{70} .

Le promoteur possède deux séquences indispensables à sa reconnaissance par le facteur σ^{70} (figure 10A). Le consensus -10 possède la séquence suivante : 5'-TATAAT-3'. Le consensus -35 possède la séquence consensus suivante : 5'-TTGACA-3'. L'absence de ce consensus -35 ou une faible conservation entraîne une dépendance de l'expression du gène vis-à-vis d'un activateur.

La longueur optimale séparant ces deux consensus est de 17 paires de bases, mais elle varie de 16 à 19 paires de bases entraînant une dépendance de l'expression du gène vis-à-vis de la conformation de l'ADN. On observe pour la plupart des promoteurs une bonne corrélation entre la force d'expression d'un promoteur et le degré de conservation de ces séquences consensus. Deux autres séquences semblent importantes dans l'initiation de la transcription des gènes. Un motif TGTG situé en amont du consensus -10 en position -15, -18 semble être reconnu par une séquence en acides aminés en amont de la région 2.4 (voir paragraphe II) sur le facteur σ^{70} . Une autre séquence conservée a été identifiée dans des promoteurs de gènes fortement exprimés [Busby et coll., 1994]. Cette forte expression a été attribuée à la présence d'une séquence riche en AT en amont du consensus -35. Cette séquence est reconnue par le complexe ARN-polymérase et plus particulièrement par le domaine C-terminal de la sous-unité α .

2) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^S .

Le promoteur consensus reconnu par le facteur σ^S n'est pas très différent de celui reconnu par le facteur σ^{70} (figure 10). Une grande partie des promoteurs dépendant de σ^S est reconnue *in vitro* par l'holoenzyme contenant le facteur σ^{70} . Des facteurs de transcription supplémentaires ou des conditions physiologiques du cytoplasme comme le degré de courbure de l'ADN [Kusano et coll., 1996], la présence de sels [Nguyen et coll., 1997], et des protéines régulatrices supplémentaires [Hengge-Aronis, 1999] permettent probablement de spécifier les promoteurs en faveur d'un des deux facteurs sigma.

Cependant, plusieurs caractéristiques permettent de prédire un promoteur potentiellement reconnu par le facteur σ^S . Tout d'abord, le facteur σ^S semble moins sensible à une séquence -35 peu conservée par rapport au facteur σ^{70} et préférentiellement remplacée par une zone de courbure [Espinosa-Urgel et coll., 1996]. Cette caractéristique pourrait être un des éléments responsables de la reconnaissance spécifique des promoteurs par le facteur σ^S [Gaal et coll., 2001]. Un promoteur consensus dépendant du facteur σ^S peut être schématisé comme suit (figure 10A) : L'absence de consensus -35, un motif TC aux positions -14/-13 et un consensus -10 TATACT. Une région riche en AT est préférentiellement trouvée entre le consensus -10 et le point d'initiation de transcription. De plus dans le consensus TATACT, le nucléotide -8 est préférentiellement un C dans le consensus reconnu par σ^S au lieu d'un A dans le consensus reconnu par σ^{70} . Le nucléotide C en position -13 apparaît très important dans la reconnaissance du promoteur par le facteur σ^S . Sa présence (85% des cas) permet d'augmenter l'expression d'un gène sous le contrôle du facteur σ^S [Becker et coll., 2001]. Puis un nucléotide T (60%) ou G (40%) semble être préféré en amont du nucléotide C -13.

3) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^E .

Une étude récente a permis de révéler une vingtaine de gènes susceptibles d'être sous le contrôle du facteur σ^E chez *E. coli* [Dartigalongue et coll., 2001a]. Les séquences -10 et -35 sont situées aux positions attendues par rapport au point d'initiation de la transcription (figure 10A). Une séquence YCTGA, située entre les nucléotides -7 et -9 par rapport au point d'initiation de la traduction représente le consensus -10. Une séquence de 2 à 6 résidus de purines contenant souvent la séquence GAA représentant le consensus -35 est située 16 nucléotides en amont du consensus -10.

4) Structure du promoteur consensus reconnu par le facteur σ^H .

Les promoteurs reconnus par le facteur σ^H possèdent le consensus -10 CCCCAT très divergent par rapport à celui reconnu par le facteur σ^{70} . Il est situé à 8 ou 10 nucléotides du point d'initiation de la transcription (figure 10A). Le consensus -35 TTGAAA est proche du consensus -35 reconnu par le σ^{70} . Les deux séquences consensus sont séparées en moyenne de 14 à 15 nucléotides. De plus, un nucléotide C très conservé juste devant le consensus -35 semble être important pour une expression forte des gènes. Une séquence supplémentaire GAA située en amont du consensus -35 est relativement bien conservée et serait impliquée dans l'activation des gènes transcrits à l'aide du facteur σ^H [Gross, 1996].

II) Structure des facteurs sigma.

Les facteurs sigma homologues à σ^{70} peuvent être divisés en trois groupes selon leur séquence en acides aminés. Le groupe 1 est représenté par le facteur σ^{70} . Les facteurs du groupe 1 possèdent au moins 51% de similitude entre eux. Le groupe 2 renferme les facteurs sigma non essentiels pour la phase exponentielle. Le facteur σ^S est compris dans cette famille. Les régions du facteur σ^S permettant la reconnaissance de promoteur sont très proches de celle des facteurs du groupe 1. Les facteurs sigma du groupe trois ont une organisation similaire au facteur σ^{70} mais présentent une faible similitude de séquences. Le groupe 3 contient en outre les facteurs σ^E et σ^H qui présentent respectivement une similitude de séquence 27% et de 24% [Lonetto et coll., 1992]. L'arbre phylogénétique permet de classer le facteur σ^E dans un sous-groupe contenant des facteurs sigma répondant à des signaux extra-cytoplasmiques [Rouviere et coll., 1995].

1) Structure du facteur σ^{70} .

La protéine du facteur σ^{70} peut être divisée en quatre domaines qui peuvent être divisés en sous-domaine (figure 10B). La partie N-terminale contient les domaines 1 et 2 et est constituée principalement de feuillets β . La partie C-terminale renferme les domaines 3 et 4 constitués principalement d'hélices α . Le domaine 2 est divisé en quatre sous-domaines. Le domaine 2.1 renferme le site de fixation au noyau de l'ARN-polymérase, le sous-domaine 2.4 renferme le site de reconnaissance du consensus -10 et les sous-domaines 2.1 et 2.3 sont impliqués dans la déshybridation de l'ADN lors de la formation du complexe ouvert. Le domaine 4 contient un motif hélice-coude-hélice (sous-domaine 4.2) qui permet sa fixation à l'ADN. Le domaine 4 est impliqué dans la reconnaissance du consensus -35. Les facteurs sigma partagent une structure commune mais des différences au niveau de la séquence en acides aminés et de la structure de la protéine permettent de générer une spécificité de promoteur [Lonetto et coll., 1992].

2) Structure du facteur σ^S .

Les régions 2.3, 2.4 et 4.2 montrent des différences par rapport aux autres facteurs. L'acide glutamique 173 de la région 2.5 du facteur σ^S est nécessaire pour la reconnaissance du nucléotide C -13. De plus, l'interaction entre cet acide aminé et ce nucléotide semble indispensable pour l'initiation de la transcription des gènes dépendant du facteur σ^S , contrairement à ce qui est observé pour l'interaction entre acide glutamique 458 du facteur σ^{70}

correspondante et le nucléotide G –13 du promoteur dépendant du facteur σ^{70} [Becker et coll., 2001]. Une séquence en C-terminal spécifique de chaque facteur appelée CTE (Carboxy-terminal Tail Element) a été localisée juste en aval du domaine 4. Cette séquence de 16 acides aminés ne semble pas être importante pour la formation de l'holoenzyme, mais semble être déterminante pour l'initiation de la transcription en particulier en présence d'ions K^+ . La séquence CTE pourrait procurer une résistance aux sels lors de la fixation du facteur σ^S sur le promoteur [Ohnuma et coll., 2000].

3) Structure du facteur σ^E .

Le facteur σ^E présente la même organisation que le σ^{70} excepté l'absence de la région 1. L'acide aminé 25 contenu dans la région 2.1 (fixation au noyau de l'ARN-polymérase) et les acides aminés 172 et 178 de la région 4.2 (reconnaissance du consensus –10) sont indispensables à l'activité du facteur σ^E [Raina et coll., 1995].

4) Structure du facteur σ^H .

L'organisation de la protéine est semblable à celle du facteur σ^{70} excepté l'absence du domaine 1. La région 2.4 impliqué dans la reconnaissance du consensus –10 possède un résidu acide en position 100 au lieu d'un résidu basique dans les facteurs σ^{70} . Le rôle de cet acide aminé dans la spécificité de reconnaissance du consensus –10 n'a pas été déterminé. Deux mutations ont été identifiées dans la région 3 de σ^H et capables de supprimer la mutation thermosensible (*rpoD800*) du facteur σ^{70} . La première est une délétion de 24 acides aminés dans la partie C-terminal de la région 3. La seconde présente un changement de l'acide aspartique 179 par un glycolle. Ces deux mutations semblent diminuer le taux de protéases intracellulaires régulées par le facteur σ^H . L'échange de l'acide glutamique 265 par une lysine entraîne une sensibilité des cellules à la température. Cet acide aminé serait impliqué dans la reconnaissance du consensus –35. La forte similitude entre les régions 4.2 des facteurs σ^{70} et σ^H peut expliquer la similitude des consensus –35 [Helmman et coll., 1988].

III) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^S .

1) Rôles physiologiques du facteur σ^S .

Durant la phase exponentielle de croissance la quantité de facteur σ^S est extrêmement faible voir absente. Lorsque les cellules sont soumises à des stress tels que l'entrée en phase stationnaire, l'augmentation brutale de l'osmolarité, la diminution du pH ou à des

changements de température, la croissance des bactéries ne devient plus optimale [Hengge-Aronis, 1999]. Dans ces conditions, le facteur σ^S est induit jusqu'à un niveau égal à 30% de celui du facteur σ^{70} [Jishage et coll., 1995]. Des complexes de l'holoenzyme de l'ARN-polymérase contenant le facteur σ^S se forment et permettent l'expression d'un grand nombre de gènes suivant la nature du stress.

Une grande variété de gènes impliqués dans différents métabolismes a été identifiée : des gènes impliqués dans la septation (*ftsQAZ*), dans l'osmotolérance (*htrE*), dans la résistance à H_2O_2 (*katG*, *katE*, *xthA*), dans la stabilisation du peptidoglycane (*dacC*), dans la régulation de la morphogenèse (*bolA*), dans le métabolisme de l'acétate (*poxB*), du tréhalose (*otsAB*), etc. Ces gènes peuvent être classés suivant leur dépendance stricte vis-à-vis du facteur σ^S . Des gènes régulés par σ^S sont activés par plusieurs stimulus : *osmY* et *treA* sont activés en phase stationnaire, et après un stress hyper-osmotique ou une privation de source de carbone. D'autres gènes possèdent plusieurs promoteurs qui peuvent être tout dépendant du facteur σ^S (*glgS*) ou non (*bolA*, *osmB*...). Les autres promoteurs sont régulés par différents signaux qui peuvent établir des connections avec d'autres circuits de régulation [Hengge-Aronis, 1996].

Dans les conditions de stress, les facteurs σ^S et σ^{70} coexistent et sont probablement en compétition pour recruter l'ARN-polymérase.

Par conséquent la régulation de la balance σ^S/σ^{70} permet de favoriser l'expression des gènes dépendants de l'un ou l'autre facteur et d'engager la cellule dans des changements physiologiques qui permettent de s'adapter aux conditions du milieu. De plus, les conditions intracellulaires (concentrations en glutamate, en tréhalose et en polyphosphates) et l'action anti-sigma du facteur Rsd vis-à-vis du facteur σ^{70} [Jishage et coll., 1999] permettent de favoriser le recrutement de l'ARN-polymérase par le facteur σ^S . L'expression des gènes dépendant du facteur σ^S est aussi régulée par des facteurs de régulation globaux tels que H-NS, Lrp, AMPc-CRP, IHF ou Fis [Hengge-Aronis, 1996].

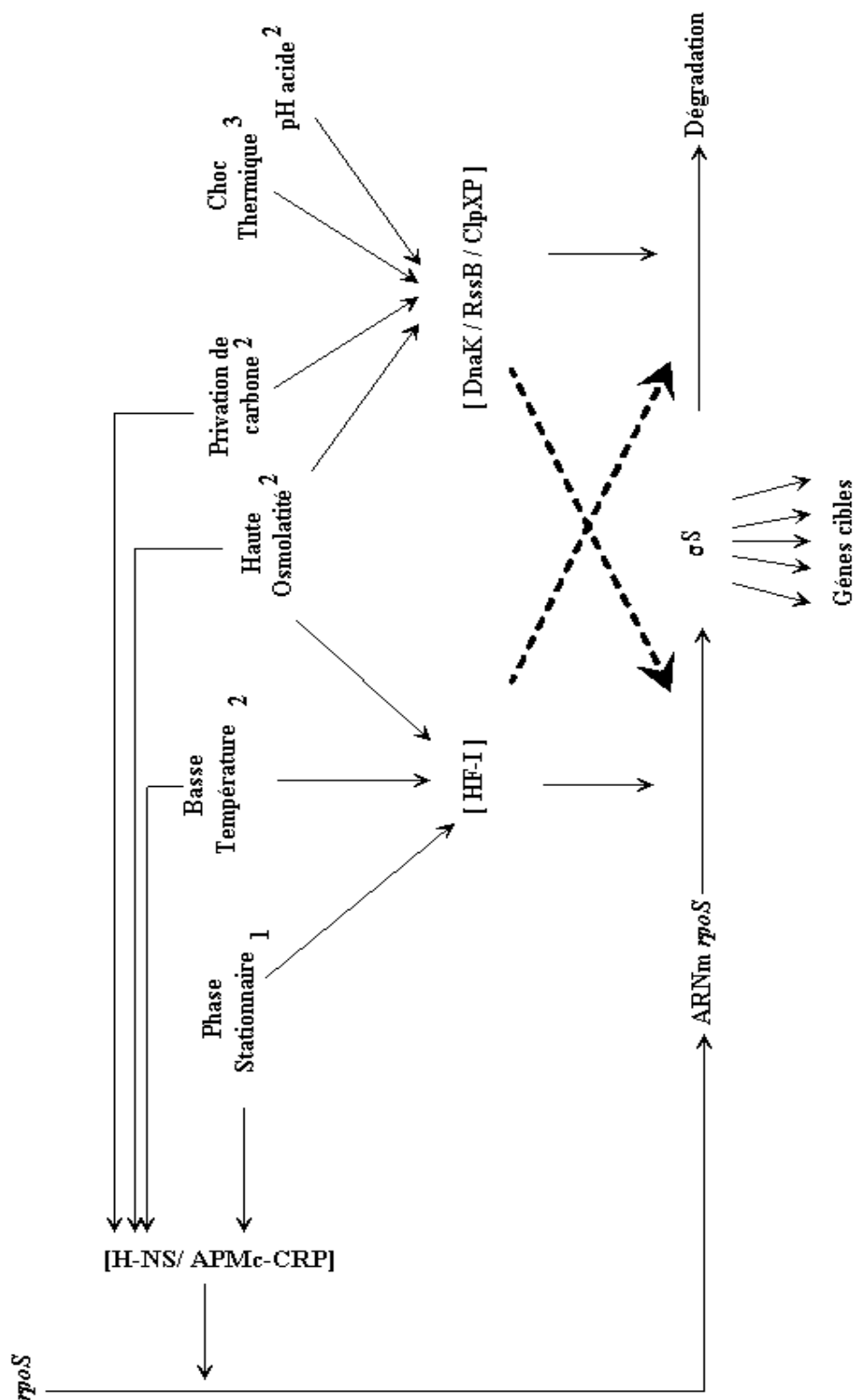


Figure 11 : Régulation du facteur σ^S . d'après Muffler [Muffler et coll., 1997b]. Exemples de stress qui influencent la transcription, la traduction ou le renouvellement du facteur σ^S . Les chiffres en exposant indiquent l'effet de stress sur la croissance des bactéries. 1 : aucun effet sur le taux de croissance. 2 : diminue le taux de croissance. 3 : augmente le taux de croissance.

Le facteur σ^S est responsable de l'induction rapide des gènes permettant de répondre rapidement à un stress, mais il est aussi impliqué en coopération avec d'autres protéines régulatrices dans des changements physiologiques important conduisant à une adaptation durable face à un environnement. De plus, la cohabitation des facteurs σ^{70} et σ^S permet d'avoir une souplesse dans l'adaptation aux conditions qui permet de maintenir la réversibilité du processus d'adaptation.

2) Régulation du facteur σ^S .

Du fait de l'importance du facteur σ^S dans la réponse à divers stress, la régulation de la concentration du facteur σ^S est très complexe (figure 11). Cette régulation s'effectue au niveau de la transcription, de la traduction et de la protéine de manière variable suivant les stress appliqués [Hengge-Aronis, 1999]. L'ARNm du gène *rpoS* est présent quelles que soient les conditions de culture même en phase exponentielle. Ceci n'empêche pas une régulation transcriptionnelle qui permet d'augmenter l'expression du gène *rpoS* d'un facteur cinq chez *E. coli* [Lange et coll., 1994]. La transcription du gène *rpoS* semble être réprimée par plusieurs régulateurs. Ainsi le complexe AMPc/CRP semble réprimer la transcription du gène *rpoS* en phase exponentielle, tout comme la protéine H-NS.

La régulation de la concentration du facteur σ^S semble s'effectuer préférentiellement au niveau traductionnel et de la stabilité de la protéine. La formation d'une structure secondaire de l'ARNm *rpoS* pré-existante joue un rôle dans la régulation de la traduction.

La protéine Hfq (HF-I) se fixe sur l'ARNm et déstabilise sa structure pour permettre l'activation de la traduction de l'ARNm du gène *rpoS*. Lors de la baisse de la température, la fixation d'un petit ARN DsrA sur l'ARNm du gène *rpoS* altère la structure secondaire de l'ARNm du gène *rpoS* activant sa traduction [Lease et coll., 2000]. Un autre ARN semble réguler la traduction de l'ARNm du gène *rpoS*. Le petit ARN RprA permet l'activation de la traduction de l'ARNm du gène *rpoS*. Cet ARN RprA est présent après un choc osmotique alors que l'ARN DsrA est absent [Majdalani et coll., 2001].

De plus, les stress tels que la baisse du pH, la privation de source de carbone, l'augmentation de la température ou de l'osmolarité, peuvent engendrer une régulation de la dégradation de la protéine σ^S . La régulation de la dégradation de la protéine dépend du complexe protéasique ClpXP et du régulateur RssB. La dégradation rapide du facteur σ^S est due à la présence d'une petite séquence d'acide aminé située en aval de la région 2.4 du facteur, absente dans le facteur σ^{70} . Cette séquence permet la fixation de la protéine RssB qui

est reconnue par la protéase ClpXP et permet la dégradation du facteur σ^S . L'affinité de RssB pour le facteur σ^S est modulée par le degré de phosphorylation de RssB dépendant des conditions de stress [Becker et coll., 1999]. La protéine RssB peut aussi agir comme un facteur anti-sigma en se fixant sur facteur σ^S sans engendrer sa dégradation et empêchant l'expression des gènes dépendants du facteur σ^S [Becker et coll., 2000].

La régulation transcriptionnelle et traductionnelle semble être requise lors d'une adaptation durable, par contre la régulation de la dégradation du facteur σ^S permet de répondre rapidement à des changements brutaux de l'environnement.

Le facteur σ^S n'apparaît pas être un facteur alternatif comme les autres. Les facteurs alternatifs tel que le facteur σ^H (32) ne permettent qu'une adaptation transitoire à un changement de l'environnement. Par contre, le facteur σ^S coopère avec le facteur σ^{70} pour répondre de manière rapide et durable face à un changement de l'environnement.

IV) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^E .

1) Rôles physiologiques du facteur σ^E .

L'activité du facteur σ^E est induite lors de la présence de protéines mal conformées dans le périplasme et lors d'une surproduction de protéines dans la membrane externe [Raivio et coll., 1999]. Plusieurs gènes ont été décrits comme appartenant au régulon σ^E : le gène *fkpA* de la petidyl-prolyl isomérase périplasmique, le gène *htrA* de la protéase périplasmique HtrA/DegP, les gènes *rpoE*, *rseABC*, *rpoH*. Afin d'identifier le régulon σ^E , deux approches ont été réalisées. La première consistait par l'insertion aléatoire sur le chromosome de *E. coli* du transposon λ Mu53-*lacZ*, générant ainsi des fusions avec le gène *lacZ* dépourvu de promoteur. La seconde consistait à cloner dans un plasmide mono-copie des petits fragments chromosomiques en amont du gène *lacZ* dépourvu de promoteur. Ces deux méthodes ont permis de mettre en évidence 20 nouveaux gènes transcrits à l'aide du facteur σ^E . Parmi ces gènes, certains codent des protéines périplasmiques impliquées dans la mise en conformation des protéines (*dsbC*, *fkpA*, *htrA*, *skp*, *surA*). D'autres gènes codent des protéines cytoplasmiques régulatrices impliquées dans la coordination de l'expression du facteur σ^E selon les conditions environnementales : les facteurs σ^E , σ^H et σ^{70} associés à l'ARN-polymérase et les protéines RseA, RseB et RseC qui régulent l'accessibilité du facteur σ^E à l'ARN-polymérase. Des produits de gènes sont impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (*rfaDFCL* et *lpxDA*) qui pourraient agir comme co-facteur dans

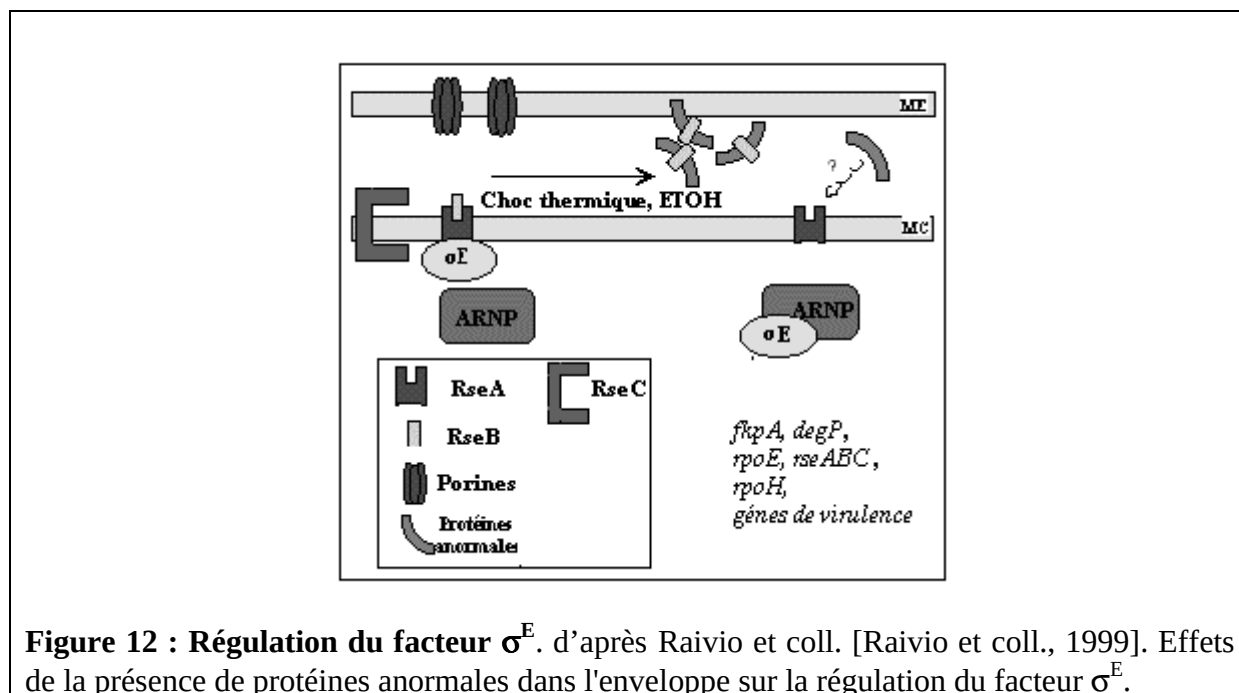
l'assemblage de la membrane externe. L'opéron *mdoGH* est aussi transcrit par le facteur σ^E [Dartigalongue et coll., 2001a]. L'implication des OPG dans la réponse initiée par la présence de protéines mal conformées n'est pas démontrée, mais les OPG pourraient interagir avec les phospholipides ou les protéines de l'enveloppe pour limiter les dommages causés par le stress thermique. Dix gènes dont la fonction est inconnue ont été révélés et nommés *ecf* pour Extracytoplasmic Encoding Function. Ces dix gènes sont potentiellement localisés dans l'enveloppe. Deux gènes *ecfE* et *ecfL* sont essentiels à la croissance des bactéries. Les fonctions précises de ces dix gènes sont inconnues, mais ils pourraient être impliqués soit dans réponse face aux protéines membranaires mal conformées, soit dans le transport ou l'assemblage du lipopolysaccharide [Dartigalongue et coll., 2001b].

2) Régulation du facteur σ^E .

La régulation de l'activité du facteur σ^E fait intervenir les protéines RseA et RseB (figure 12). La protéine RseA est un anti-sigma inséré dans la membrane cytoplasmique. En absence de protéines mal conformées dans le périplasme, la protéine RseB périplasmique se fixe sur la protéine RseA, ce qui augmente l'affinité de RseA pour le facteur σ^E . Le σ^E est alors séquestré empêchant toute association avec l'ARN-polymérase. En présence de protéines mal conformées dans le périplasme, La protéine RseB est déplacée de RseA par les protéines mal conformées. L'affinité entre RseA et le facteur σ^E diminue entraînant la libération du facteur σ^E . A ce moment, le facteur σ^E peut s'associer à l'ARN-polymérase et induire l'expression des gènes du régulon σ^E [Raivio et coll., 1999]. La protéine RseC de la membrane cytoplasmique semble activer le facteur σ^E en jouant le rôle d'un facteur anti-anti sigma inhibant la fixation de σ^E sur la protéine RseA. De plus la protéine DegS semble être impliquée directement ou indirectement dans la dégradation de la protéine RseA [Ades et coll., 1999].

Le facteur σ^E est codé par le gène *rpoE* qui est le premier gène d'un opéron *rpoErseABC*. La transcription s'effectue à partir de deux promoteurs P1 et P2. A 50°C, la transcription s'effectue exclusivement à partir du promoteur P2. Le promoteur P2 est régulé positivement par le facteur σ^E . L'activité du facteur σ^E est induite d'un facteur huit, 10 min après un choc thermique. Or la transcription n'est induite que de 1,5 fois. Ce résultat suggère qu'il existe une réserve de facteurs σ^E séquestrés par la protéine RseA. Une transcription basale à partir du promoteur P1 ou P2 permettrait la synthèse des facteurs σ^E . Lors d'un choc thermique, les facteurs σ^E seraient libérés de RseA et permettraient la transcription des gènes

du régulon σ^E [Rouviere et coll., 1995], [Raina et coll., 1995].



La nature du signal permettant de déclencher l'activation du facteur σ^E n'est pas clairement établie. Une hypothèse suggère que la disponibilité des protéines responsables de la mise en conformation des protéines du périplasme et de la membrane externe (SurA, FkpA, PpiD, RseB) puisse être le signal de déclenchement. En présence de protéines mal conformées, ces protéines anormales pourraient accaparer les protéines RseB et RseC qui ne protégeraient plus directement ou indirectement la protéine RseA de la dégradation [Ades et coll., 1999] engendrant la libération du facteur σ^E .

V) Rôles physiologiques et régulation du facteur σ^H .

1) Rôles physiologiques du facteur σ^H .

Le facteur σ^H permet la transcription de protéines Hsp (Heat-shock protéines) comprenant des protéases et des protéines chaperons comme dans le régulon σ^E . Les gènes codant les protéines chaperons DnaK, DnaJ et GrpE, qui agissent en coopération, les protéines GroEL et GroES, la protéine HtpG, les protéines IbpAB font partis du régulon σ^H . Les gènes codant les protéases sont l'autre type de gènes inclus dans le régulon σ^H . Les gènes codant la protéase Lon, les protéases de la famille Clp (ClpA, ClpB, ClpY, ClpX,) et la protéine HflB sont compris dans ce régulon. Ces protéases et ces chaperons induits lors d'un choc thermique

partagent des caractéristiques communes. Elles dépendent toutes de l'ATP pour initier leur action. Ces protéines sont capables de reconnaître des caractéristiques des protéines mal conformées et de s'y fixer ce qui engendre un changement de conformation intrinsèque qui active leur fonction respective. Elles fonctionnent toutes en complexe. Le mécanisme d'action des chaperons n'est pas clairement identifié, mais ces protéines sont impliquées dans la dégradation générale et dans la dégradation spécifique de protéines cellulaires. Le complexe protéines mal conformées-chaperons ou le changement de conformation provoqué par les chaperons sur des protéines mal conformées permettrait la reconnaissance et la dégradation de ces protéines mal conformées par les complexes protéolytiques [Gross, 1996].

2) Régulation du facteur σ^H .

L'activation de la transcription des protéines Hsp est due en grande partie à l'augmentation de la traduction, de la stabilité et l'activité du facteur σ^H . Lors d'un choc thermique l'augmentation du niveau de facteur σ^H est en majorité engendrée par une augmentation de la traduction et de la stabilité de la protéine régulée par les protéines chaperons DnaK/DnaJ (figure 13). La formation de protéines anormales, provoquée par diverses conditions extérieures, induit la réponse liée au choc thermique, mais certaines conditions engendrent l'augmentation de la stabilité du facteur σ^H sans augmenter sa synthèse [Morita et coll., 1999].

Même si dans la réponse au choc thermique, le niveau de régulation du facteur σ^H est post-transcriptionnel, une régulation transcriptionnelle complexe s'effectue à partir de quatre promoteurs.

Le promoteur P3, reconnu par le facteur σ^E permet d'impliquer le régulon σ^H dans la réponse face des protéines anormales situées dans l'enveloppe. Les promoteurs P1, P4 et P5 sont reconnus par le facteur σ^{70} . Les promoteurs P1 et P4 assurent 90% de la transcription du gène *rpoH* à 30°C. A 50°C, la transcription s'effectue à partir du promoteur P3. L'expression du gène *rpoH* est aussi relié au métabolisme des sources de carbone via le régulateur AMPc/CRP (répresseur) qui reconnaît le promoteur P5, à la réplication de l'ADN via la protéine DnaA qui reconnaît les promoteurs P3 et P4 et au métabolisme des ribonucléosides et des désoxyribonucléosides via l'anti-activateur CytR (répresseur) en coopération avec CRP qui reconnaissent les quatre promoteurs. Cette multi-régulation transcriptionnelle face à de multiples conditions permettrait de transcrire une réserve d'ARNm quelles que soient les conditions de milieu.

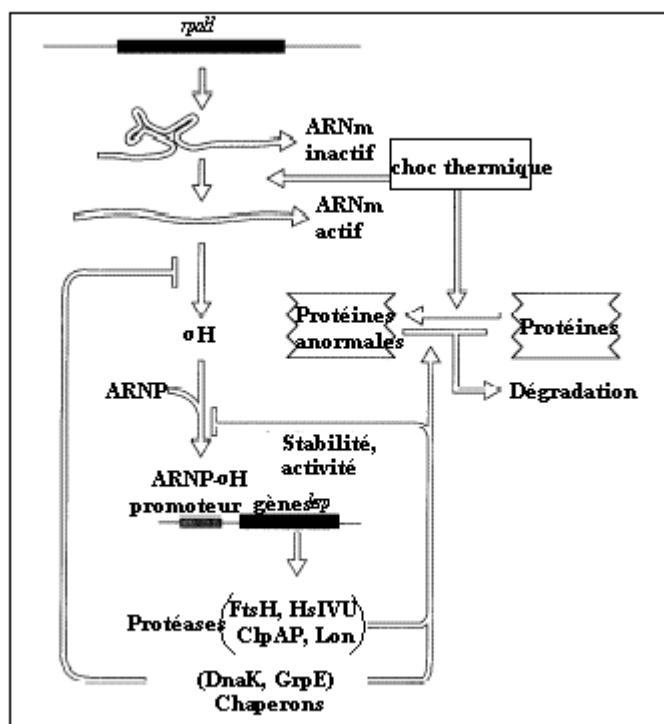


Figure 13 : Régulation du facteur σ^H . D'après Yura et coll. [Yura et coll., 1999]. Effet du choc thermique sur la régulation de la traduction et de la stabilité du facteur σ^H .

Des régulations post-traductionnelles permettraient d'utiliser cette réserve suivant le type de stress imposé à la cellule [Kallipolitis et coll., 1998].

La régulation de la traduction s'effectue grâce à trois régions de l'ARNm. La région A renferme une séquence reconnue par l'ARN 16 S du ribosome supplémentaire à la séquence de Shine-Dalgarno, et permet d'augmenter la capacité de traduction. La région B est capable de former une structure secondaire qui masque la séquence précédente et le codon d'initiation. Cette structure secondaire pourrait être modulée par la température permettant la traduction de l'ARNm *rpoH*. Une troisième séquence incluse dans la phase codante régule la traduction. Lors de la traduction, les chaperons DnaK-DnaJ-GrpE se fixeraient sur les acides aminés 122 à 144 de la protéine RpoH en cours de synthèse pour réprimer la traduction. La régulation de la traduction semble donc s'effectuer en *cis* par l'intermédiaire de la structure secondaire de l'ARNm et en *trans* grâce aux protéines chaperons DnaK-DnaJ-GrpE.

Plusieurs protéines permettent de réguler la stabilité du facteur σ^H . La protéase FtsB, dont le gène est compris dans le régulon σ^H , permet la dégradation du facteur σ^H . Les trois protéines DnaK-DnaJ-GrpE sont aussi impliquées dans la dégradation du facteur σ^H en coopération avec FtsB. Les acides 122 à 144 impliqués dans la répression de la traduction

sont aussi reconnus par ce complexe qui régule la stabilité du facteur σ^H . Ces protéines pourraient aussi séquestrer le facteur σ^H et l'empêcher de s'associer à l'ARN-polymérase ou inhiberaient l'holoenzyme associé avec le facteur σ^H [Gross, 1996]. Par contre, FtsH ne peut pas dégrader la forme du facteur σ^H associée à l'ARN-polymérase. La libération du facteur σ^H serait due à la rétention des protéines DnaK par les protéines anormales cytoplasmiques lors d'un choc thermique. Ceci conduirait à l'activation transcriptionnelle du régulon σ^H [Arsene et coll., 1999]. Inversement, en absence de protéines anormales, la protéine DnaK en coopération avec les protéines DnaJ et GrpE s'associeraient alors au facteur σ^H pour le séquestrer ou favoriser sa dégradation par les protéases.

La régulation du facteur σ^H s'effectue à plusieurs niveaux et les signaux semblent être différents suivant le niveau de régulation. Le choc thermique, l'éthanol et l'augmentation de protéines cytoplasmiques anormales induisent la stabilisation du facteur σ^H . Par contre, la traduction n'est induite que par les deux premiers stress. Ainsi, tout stress qui ferait augmenter la concentration des protéines anormales activerait le régulon σ^H par la voie DnaK. Par contre, la traduction serait régulée par des signaux (thermique) qui engendreraient directement des changements de la conformation de structure secondaire de l'ARNm du gène *rpoH*.

Le fait que des modes de régulation complexes des facteurs σ^S , σ^E et σ^H font intervenir des régulateurs communs suggère une coopération entre ces régulons qui est une des clefs de la grande efficacité d'adaptation des bactéries à divers milieux. L'adaptation à un choc hyper-osmotique en est un exemple. La transcription du facteur σ^E serait induite par la formation de protéines anormales de l'enveloppe provoquée par la diminution de la pression de turgescence. Le facteur σ^E activerait la transcription du régulon σ^E dans lequel se trouve le facteur σ^H . De plus, l'augmentation des ions K^+ dans le cytoplasme modulerait la structure secondaire de l'ARNm du gène σ^H pour activer sa traduction [Bianchi et coll., 1999]. L'induction des régulons σ^E et σ^H permettrait une réponse rapide et faciliterait la mise en conformation des protéines synthétisées lors du choc hyper-osmotique. Ceci contribuerait à une meilleure action de la réponse coordonnée par le facteur σ^S qui reste le facteur principal pour adapter la physiologie bactérienne face à un choc hyper-osmotique.

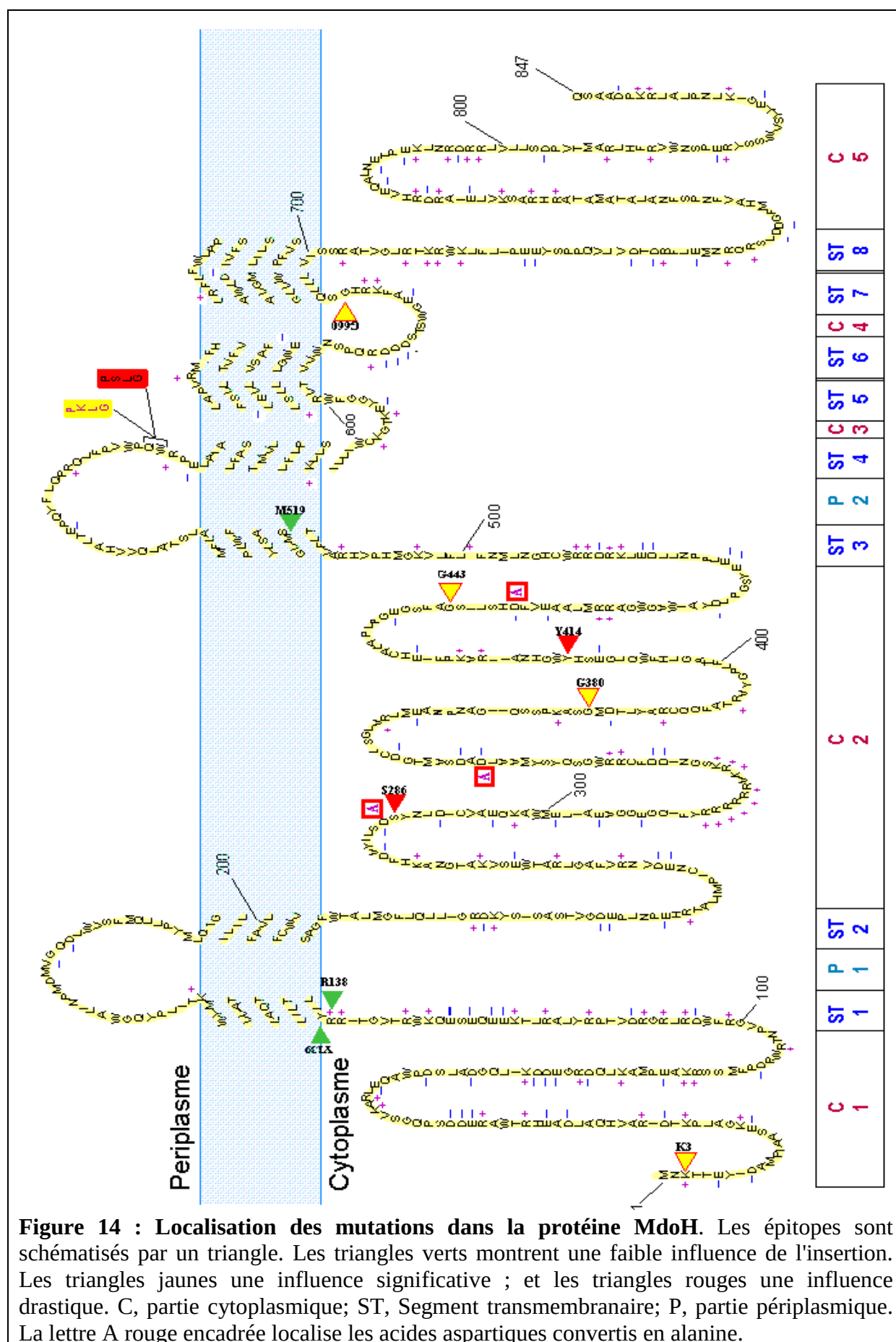
Partie I : Etude fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH.

Les protéines MdoG et MdoH sont toutes deux indispensables à la biosynthèse du squelette glucosidique des OPG chez *E. coli*. La protéine MdoH possède un domaine de glycosyltransférase de la famille 2 [Saxena et coll., 1995] qui permet la synthèse *in vitro* d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 à partir de l'UDP-glucose et en présence d'ACP [Weissborn et coll., 1984]. MdoH est une protéine membranaire de 97 kda possédant 8 segments transmembranaires (figure 14). Trois larges domaines cytoplasmiques ont été décrits : le premier domaine noté C1, situé en N-terminal, possède 138 acides aminés, le domaine C2 central possède 303 acides aminés et le domaine C5 possède 146 acides aminés situés en C-terminal. La protéine MdoH possède peu d'acides aminés orientés vers le périplasme : Deux boucles périplasmiques significatives sont formées de 32 et 33 acides aminés localisés respectivement entre les segments transmembranaires II et III et entre les segments transmembranaires III et IV.

La fonction de la protéine périplasmique MdoG n'est pas connue. Elle pourrait intervenir en coopération avec la protéine MdoH dans l'activité de branchement des OPG (synthèse de liaison glucosidique β -1,6) et ou dans la translocation de la chaîne linéaire naissante à travers la membrane cytoplasmique.

Chez de nombreuses espèces, des gènes homologues à *mdoG* et *mdoH* ont été identifiés. Le défaut d'OPG chez plusieurs bactéries pathogènes entraîne une absence de virulence suggérant un rôle essentiel des OPG dans le développement des bactéries chez leur hôte.

C'est pourquoi nous avons initié une étude de la topologie fonctionnelle de ces deux protéines MdoG et MdoH afin d'appréhender les régions indispensables à leur fonction et d'élucider la fonction exacte de MdoG. Pour cela trois types de mutagenèses ont été réalisés : une mutagenèse par insertion aléatoire d'épitope sur les deux protéines MdoG et MdoH, une mutagenèse par l'insertion localisée d'un épitope dans la seconde boucle périplasmique de la protéine MdoH et une mutagenèse dirigée contre 3 acides aminés de la protéine MdoH conservés des familles de glycosyltransférases.



A) Etude de la topologie fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH.

I) Insertions d'un épitope dans les protéines MdoG et MdoH.

1) Insertions aléatoires d'un épitope EP31 *Bam*HI.

Cette méthode a été mise au point par Manoil et coll. [Manoil et coll., 1997]. Cette analyse a permis de délimiter des régions permissives et non-permissives à l'insertion d'épitopes de 31 acides aminés dans la protéine LacY. Nous avons donc utilisé cette méthode pour appréhender les régions requises pour l'activité des protéines MdoG et MdoH.

a) Principe.

Cette mutagenèse aléatoire par insertion d'épitope a été réalisée par l'insertion d'un transposon *Tn**lacZ*/in ou *Tn**phoA*/in (figure 15) portant tous deux le gène de résistance à la kanamycine (*neo*) et le gène *sacB* dans la partie centrale du transposon. Ces transposons contiennent dans l'IS50 gauche un gène de résistance au chloramphénicol et un gène rapporteur (*lacZ* ou *phoA*) dépourvu de promoteur et dont la protéine est tronquée de quelques acides aminés en N-terminal, ce qui permet de créer une protéine hybride, entre la protéine étudiée et le produit du gène rapporteur, repérée par la coloration bleue [Manoil et coll., 1997].

Ces transposons sont utilisés pour muter des souches portant le plasmide contenant le gène à étudier. L'insertion du transposon est sélectionnée sur un milieu contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Les colonies sont récupérées et leurs plasmides sont extraits et utilisés pour transformer de nouvelles bactéries. Ces dernières sont étalées sur un milieu contenant du chloramphénicol, de l'ampicilline, du saccharose (5%) permettant de sélectionner les plasmides ayant insérés uniquement l'IS gauche du transposon. Du X-gal ou du X-phosphate est utilisé respectivement pour tester l'activité de la β -galactosidase ou de la phosphatase alcaline. Les bactéries contenant les plasmides portant le transposon entier ne forment pas de colonies du fait de la présence du gène *sacB*, toxique en présence de saccharose (5%). Les colonies bleues possèdent donc uniquement une insertion de l'IS gauche en fusion traductionnelle dans le gène étudié. L'IS gauche étant bordée par des sites de restriction *Bam*HI, les plasmides sont digérés par cette enzyme permettant l'élimination de la quasi-totalité de l'IS gauche. Les 93 paires de bases restantes forment un épitope de 31 acides

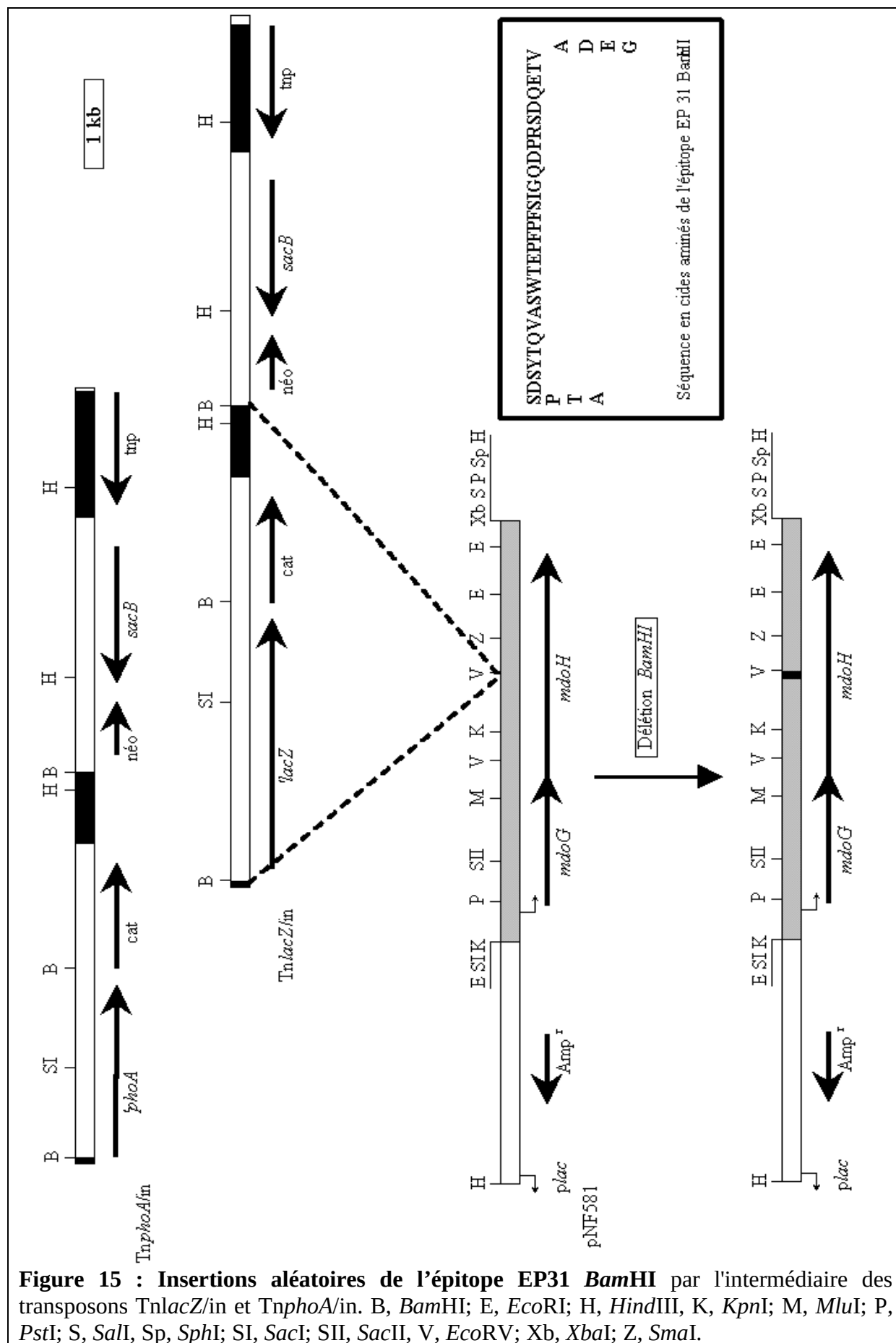
aminés (figure 15) en phase dans la protéine étudiée. Le point d'insertion de ces 93 paires de bases est localisé par séquençage en utilisant une amorce contenue dans ces 93 paires de bases.

La souche CC118 portant la mutation *recA*, transformée par le plasmide pNF581 (*mdoGH*), a été utilisée pour être la souche infectée par les phages λ Tn*lacZ*/in et λ Tn*phoA*/in pour éviter la recombinaison entre le plasmide et le chromosome. La production des phages λ Tn*lacZ*/in et λ Tn*phoA*/in a été réalisée dans la souche CC245 qui possède la mutation *dam*. Cette mutation empêche la méthylation de l'ADN. La transposition étant régulée en partie par la méthylation des IS du transposon, l'absence de résidu méthyle sur l'ADN des phages augmente la fréquence de transposition des transposons Tn*LacZ*/in et Tn*PhoA*/in lors de l'infection des bactéries par le phage λ Tn*lacZ*/in ou λ Tn*phoA*/in.

b) Insertions aléatoires de l'IS50 gauche.

L'élimination de la quasi-totalité de l'IS gauche s'effectue par la digestion du plasmide avec l'enzyme de restriction *Bam*HI. Le plasmide pNF449 portant l'opéron *mdoGH* au site *Sma*I du vecteur pUC19 digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI a donc été bouché par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I en présence des quatre dNTP et relié grâce à l'ADN ligase du bactériophage T4 pour éliminer le site *Bam*HI du multi-sites de clonage. Le plasmide dépourvu de site *Bam*HI résultant est nommé pNF581 (figure 15).

Une culture de la souche NFB1484 (pNF581) de la nuit est aliquotée en petites cultures indépendantes de 0,2 ml qui sont ensuite infectées par l'un des phages. Plusieurs essais avec différentes multiplicités ont été effectués. Les meilleurs résultats (obtention de clones bleus) ont été obtenus avec une multiplicité d'infection de 0,3 pour le phage λ Tn*lacZ*/in et de 0,3 et 0,5 pour le phage λ Tn*phoA*/in. Les cultures ont été incubées 2 heures à 30°C pour le phage λ Tn*lacZ*/in et 7 à 8 heures pour le phage λ Tn*phoA*/in ; puis étalées sur des boîtes contenant de l'ampicilline, pour sélectionner la présence du plasmide, et du chloramphénicol pour sélectionner la présence du transposon. 1000 à 1500 colonies et 500 à 1000 colonies ont été respectivement obtenues à partir de chaque culture indépendante infectée avec le phage λ Tn*lacZ*/in ou avec le phage λ Tn*phoA*/in. Les expériences ont révélé qu'un titre trop faible du lysat lambda diminue fortement l'obtention de clones résistants au chloramphénicol. Un titre de 10^{10} est nécessaire pour obtenir suffisamment de clones. 150 mutagenèses ont été réalisées sur l'opéron *mdoGH* avec chaque phage.



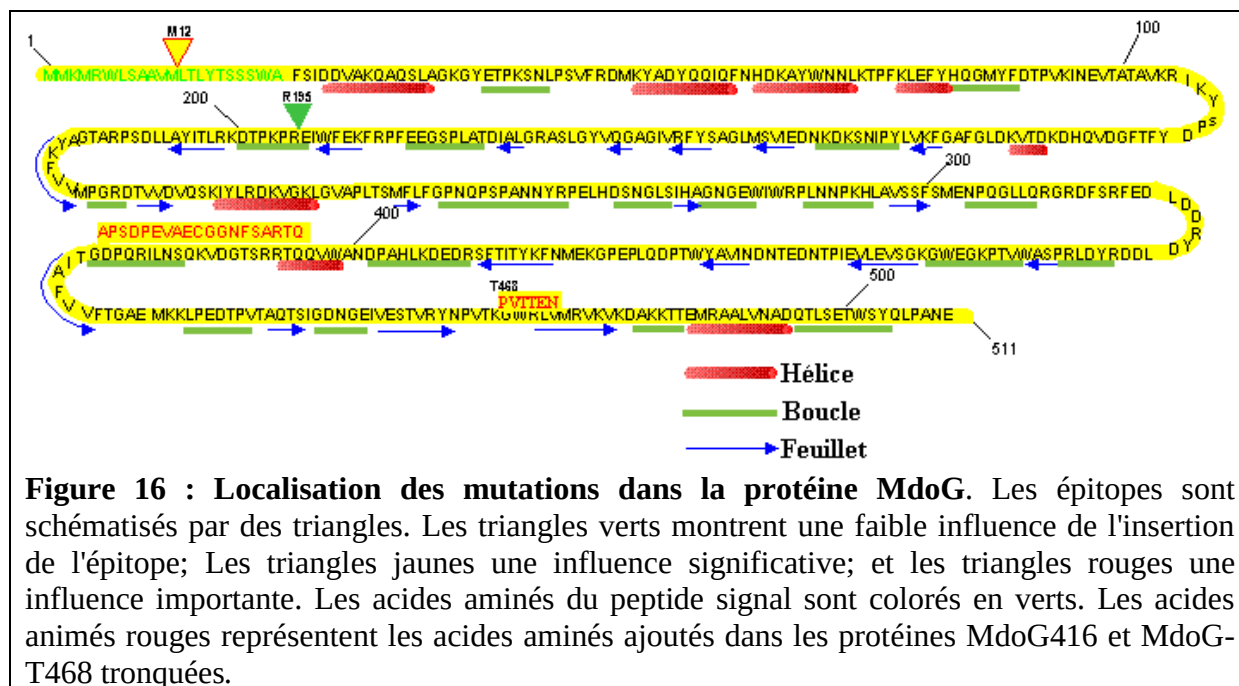
L'ensemble des clones de chaque boîte a été récupéré pour en extraire les plasmides. Ces derniers ont été utilisés pour transformer la souche CC118. Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline, du chloramphénicol, du saccharose (5%) et du X-gal ou du X-P, selon le transposon utilisé, afin de sélectionner les plasmides ayant insérés l'IS gauche. Un clone bleu a été récupéré pour chaque culture indépendante. Sur l'ensemble de ces mutagenèses, 27 clones bleus ont été récupérés après la mutagenèse par le transposon *Tn_{lacZ}/in* ; et 14 avec le transposon *Tn_{phoA}/in*. Une vérification de l'absence de clones contenant le transposon entier a été effectuée en testant la sensibilité de ces clones à la kanamycine.

c) Localisation des insertions.

Chacun des clones a subi une digestion par l'enzyme de restriction *Bam*HI afin d'éliminer la quasi-totalité de l'IS gauche en ne laissant qu'une séquence de 93 paires de bases. La localisation des insertions de la séquence de 93 pb dans la phase codante de la protéine MdoG ou MdoH a été réalisée par séquençage en utilisant l'amorce EP31 (Matériels et Méthodes). Sur les 27 insertions obtenues avec le transposon *Tn_{LacZ}/in*, seul 8 se sont révélées être en phase dans la protéine MdoH ; et 5 parmi les 14 obtenues avec le transposon *Tn_{phoA}/in* dont 4 dans la protéine MdoG et 1 dans la protéine MdoH. La fréquence d'insertion en fusion parmi les clones bleus est donc de 30% avec le transposon *Tn_{LacZ}/in* et de 35% avec le transposon *Tn_{PhoA}/in*.

La position des différentes insertions est reportée dans les figures 14 et 16. Les insertions sont numérotées comme suit : K3, R138, Y139, S286, G380, Y414, G443, M519 et G660 dans la protéine MdoH (figure 14); et M12, R195, T468 dans la protéine MdoG (figure 16). La première lettre correspondant à l'acide aminé modifié par l'insertion de l'épitope et le nombre à la position de cet acide aminé.

Toutes les insertions dans la protéine MdoH sont localisées du côté cytoplasmique, que se soient celles obtenues avec le transposon *Tn_{LacZ}/in* ou celle avec le transposon *Tn_{PhoA}/in*. Une insertion est située dans la partie C1 cytoplasmique dans le troisième acide aminé (K3) et deux au bord du premier segment transmembranaire (R138 et Y139). Quatre insertions (S286, G380, Y414 et G443) sont situées dans la large partie C2 cytoplasmiques et répartie de manière relativement homogène. Une insertion (M519) est située dans le troisième segment transmembranaire. La dernière insertion (G660) est située dans la partie C4 cytoplasmique au bord du segment transmembranaire VII.



Trois insertions différentes (M12, R195 et T468) ont été obtenues dans la protéine MdoG. Pour l'insertion T468, le transposon s'est inséré en sens inverse par rapport à l'opéron *mdoGH*, ce qui a entraîné un changement dans la nature de l'épitope avec la création d'un codon stop après le 6^{ème} acide aminé inséré. La protéine MdoG-T468 mature possède donc 455 acides aminés et un poids moléculaire calculé de 50776 kda

Deux insertions (M12) sont situées au niveau du peptide signal dans l'acide aminé 12. Il est possible que cette séquence soit un point chaud d'insertion du transposon *TnPhoA/in*.

De manière générale, les deux transposons *TnLacZ/in* et *TnPhoA/in* s'insèrent de préférence devant un nucléotide guanine que ce soit en phase ou pas, avec une fréquence de 50% environ.

2) Insertion dirigée d'un épitope dans la seconde boucle périplasmique de la protéine MdoH.

Cette construction a été réalisée lors du DEA Elisabeth Kosciarz [Kosciarz, 1995]. Le plasmide pNF446 a été coupé par l'enzyme de restriction *BglI* et les extrémités ont été rendues franches. Un oligonucléotide *HindIII* (CCCAAGCTTGGG) double brin de 12 paires de bases a été inséré dans ce site. 2 clones ont été retenus et séquencés. Le premier clone possède l'oligonucléotide correctement inséré, mais il manque trois nucléotides de la séquence du gène *mdoH* correspondant à l'acide aminé W562 (pNF483). Ce qui équivaut à une insertion de quatre acides aminés (PKLG) en place des acides aminés Q561 et W562. Le

second clone possède l'insertion attendue de l'oligonucléotide ; soit une insertion de quatre acides aminés (PSLG) en place de l'acide aminé Q561 (pNF484). Les épitopes générés sont nommés respectivement PSLG et PKLG et les insertions Q561 et QW562.

3) Génération de l'allèle *mdoG215*.

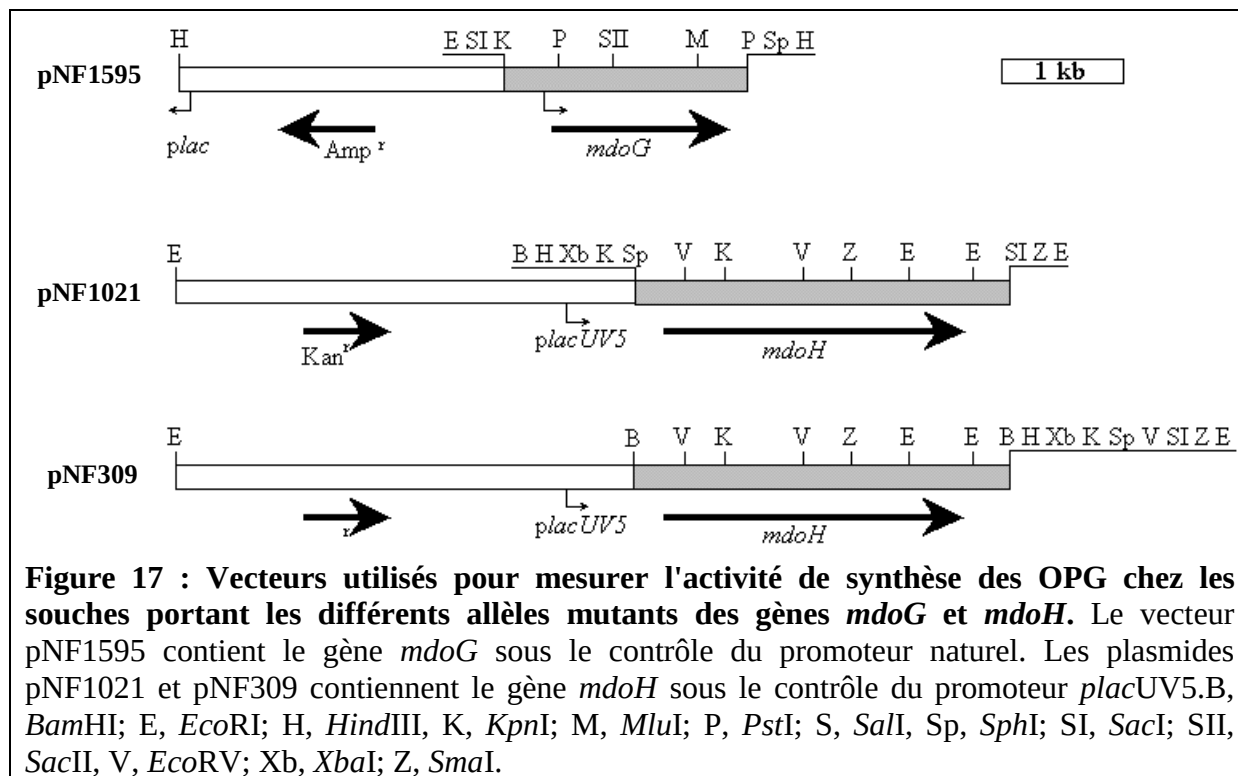
Cette construction a été réalisée par Laurent Debarbieux dans le cadre de sa thèse [Debarbieux, 1995]. Elle a eu pour but de rechercher un couplage traductionnel entre les gènes *mdoG* et *mdoH*. Pour cela, le plasmide pNF244 a été linéarisé par l'enzyme de restriction *MluI* localisé dans la partie codant le C-terminal de la protéine MdoG. Ce site de restriction a été bouché et le plasmide refermé par ligation (pNF424). La protéine MdoG résultante est tronquée de 89 acides aminés initiaux et modifiée par 16 nouveaux acides aminés donnant une protéine maturée de 416 acides aminés et nommée MdoG416 (figure 16). Les résultats ont révélé l'absence de couplage traductionnel entre ces deux gènes. Par contre, la quantité d'OPG synthétisés dans la souche portant l'allèle *mdoG215* est inférieure à celle de la souche sauvage.

II) Influences des mutations sur l'activité des protéines MdoG et MdoH et sur la structure des OPG.

1) Analyses de l'activité de synthèse des protéines MdoG et MdoH.

Les activités des protéines MdoG et MdoH ont été analysées par la quantification des OPG synthétisés *in vivo*. Pour cela, Les OPG ont été radio-marqués sur les résidus de phosphoglycérol à l'aide du glycérol tritié en 2 (voir Matériels et Méthodes). Une première tentative de mesure de la synthèse des OPG a été effectuée à partir des souches NFB739 (BB2636 *mdoG202::néo*) portant chacune l'opéron *mdoGH* entier avec les différentes insertions d'épitope. Il s'est avéré que la présence de l'opéron entier sur un plasmide multicopies entraînait une lyse des bactéries lors de l'ensemencement du milieu LOS engendrant une grande disparité dans les dosages des OPG. Par conséquent, nous avons décidé de séparer les deux gènes *mdoG* et *mdoH* dont nous savions qu'ils s'exprimaient séparément sur un plasmide multicopies sans perturber la physiologie de la bactérie et la nature des OPG (figure 17). Pour éliminer le gène *mdoH*, une délétion par l'enzyme de restriction *EcoRV* a été réalisée. Les plasmides ne contenant que le gène *mdoG* ont été introduits dans la souche NFB739 (BB2636 *mdoG202::neo*). Pour éliminer le gène *mdoG*, un sous clonage du gène *mdoH* a été nécessaire. Un fragment *MluI-HindIII* rendu bout franc a été

sous-cloné dans le site *EcoRV* du vecteur pYZ4 et orienté de manière à être sous le contrôle du promoteur *placUV5*. Les plasmides ont été introduits dans la souche NFB1990 (BB2636 *mdoH200::Tn10*).



Les OPG radio-marqués sur les résidus de phosphoglycérol ont été extraits à partir de 20 ml de culture. Les OPG ont ensuite été purifiés sur une colonne de filtration sur gel. Les fractions contenant les OPG ont été regroupées. La quantité d'OPG synthétisés a été analysée à la fois par le dosage du glycérol tritié incorporé et par le dosage du glucose à l'antrone présent dans les fractions récupérées. La quantité d'OPG a été ramenée en nanomoles.

a) Activité de synthèse des mutants de la protéine MdoG.

Les OPG produits par les différents mutants de la protéine MdoG sont élués de manière identique à ceux d'une souche sauvage sur une colonne de filtration sur gel (figure 18). On observe une diminution de 20 % de la synthèse des OPG chez la souche portant l'insertion R195.

Par contre, des baisses importantes de 67%, 73% et 68% de la biosynthèse des OPG sont mesurées respectivement avec les protéines mutantes MdoG-M12, MdoG-T468 et MdoG416 (figure 19A). L'épitope de la mutation M12 se situe dans la partie H hydrophobe du peptide signal. Nous pouvons donc supposer que la protéine résultante soit mal sécrétée

dans le périplasme.

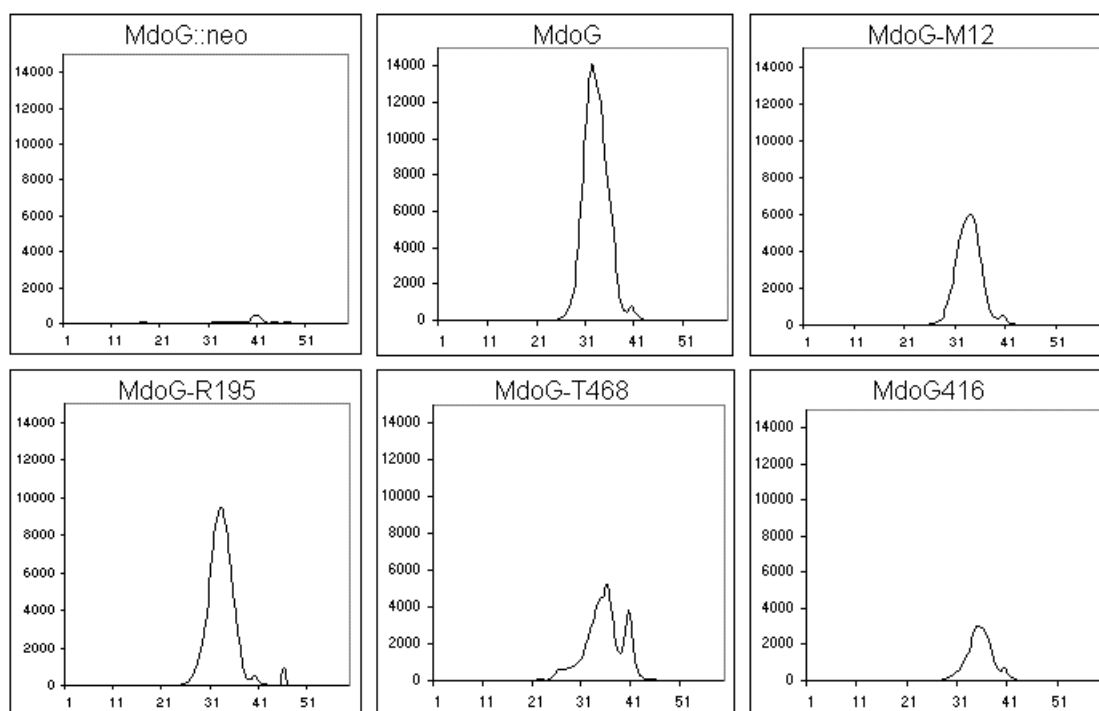


Figure : 18 : Séparation des OPG produits *in vivo* à l'aide des protéines MdoG provenant des allèles mutants du gène *mdoG*. La séparation a été effectuée sur une colonne de filtration Biogel P4. Les axes des ordonnées représentent la radioactivité (cpm) due au (2-³H) glycérol. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

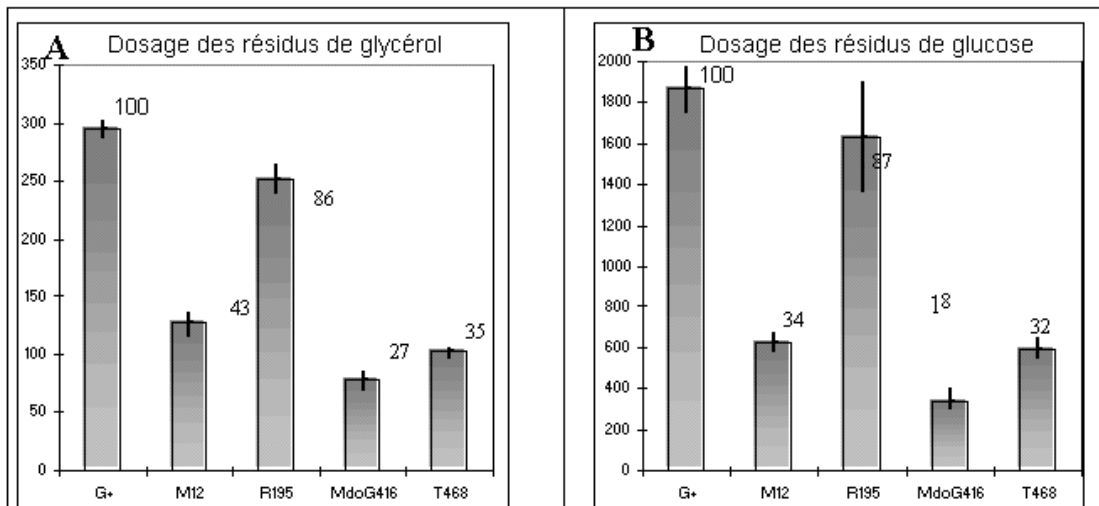


Figure 19 : Dosage des résidus de glycérol (A) et de glucose (B) des OPG produits à l'aide des protéines MdoG mutantes. Les chiffres correspondent aux pourcentages de biosynthèse des OPG issus des souches portant les allèles mutants par rapport à la celle de la souche portant l'allèle sauvage du gène *mdoG*. Les axes des ordonnées sont exprimés en nanomoles. Les abscisses représentent les types de mutations.

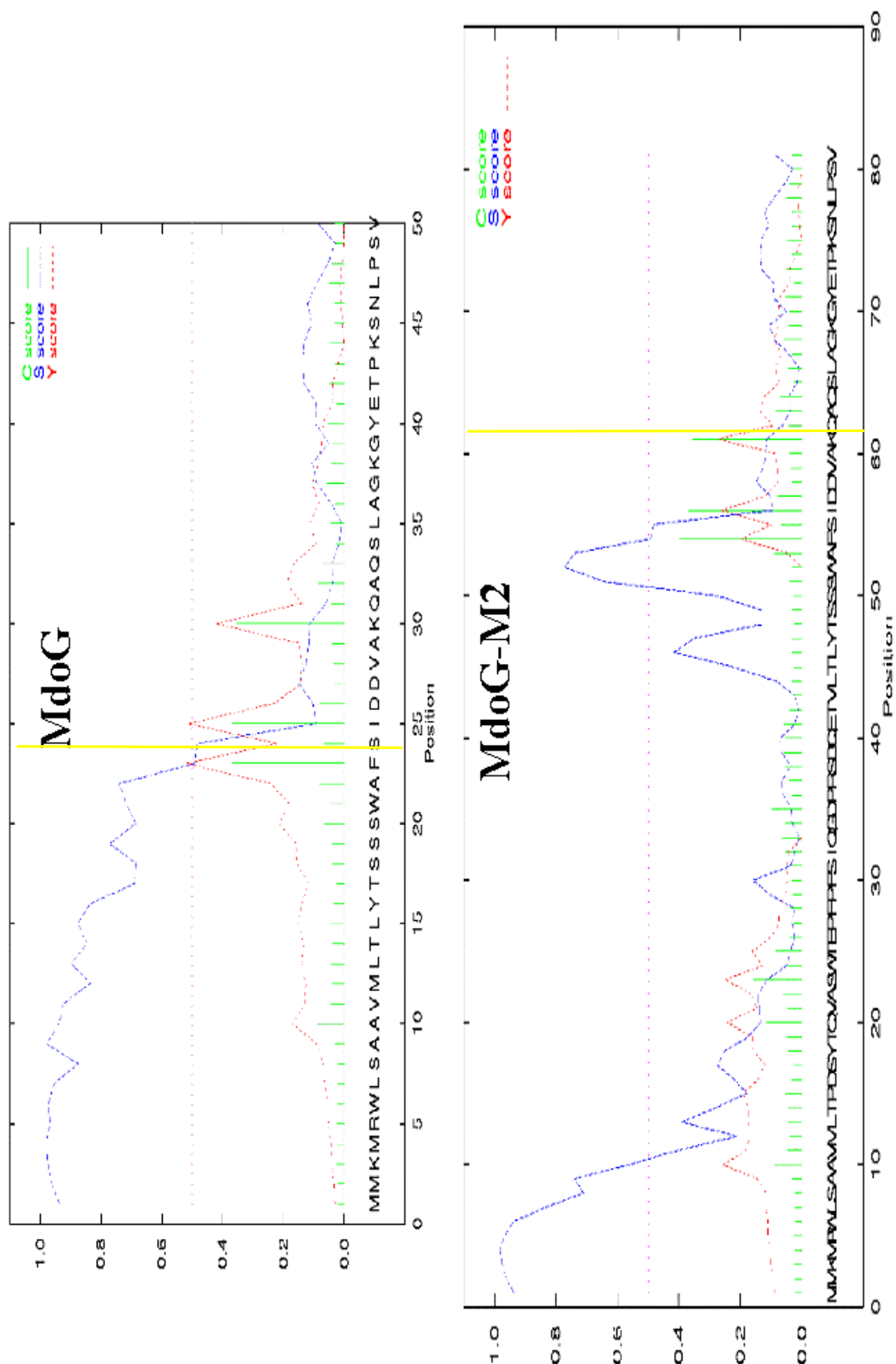


Figure 20 : Prédiction du peptide signal des protéines MdoG et de MdoG-M12. La ligne jaune symbolise la maturation du peptide signal prédite par le programme Signal V1. Les axes des abscisses représentent les positions des acides aminés.

Une prédiction du peptide signal a été réalisée sur les 50 premiers acides aminés de la protéine MdoG et les 81 premiers acides aminés de la protéine MdoG-M12 (50 premiers acides aminés de MdoG plus les 31 acides aminés apportés par l'épitope EP31 *Bam*HI) par le programme SignalP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/output.htm>) (figure 20).

Une maturation après l'alanine 22 pour la protéine MdoG sauvage et une maturation après l'alanine 60 de la protéine MdoG-M12 (correspondant à l'alanine 29 de la protéine MdoG sauvage) ont été prédites par ce programme. Le peptide signal prédit pour la protéine sauvage se trouve scindé en deux parties par l'épitope EP 31 *Bam*HI, de caractère plutôt hydrophile, dans la protéine MdoG-M12. Les scores de prédiction de la coupure du peptide signal de la protéine MdoG-M12 sont médiocres, ce qui suggère une maturation peu efficace de la protéine. Ceci provoquerait un déficit des protéines MdoG dans le périplasme et entraînerait une diminution des complexes MdoG-MdoH et par conséquent une diminution de synthèse des OPG.

La mutation R195 ne provoque qu'une faible diminution. Cette position ne semble donc pas être critique pour la fonction et la conformation de la protéine MdoG. Par contre, les protéines MdoG416 et MdoG-T468 ont provoqué une diminution importante (73% et 68%) de la synthèse des OPG. Les 83 derniers acides aminés de la protéine MdoG semblent être important pour son activité.

Le dosage du glucose des fractions récupérées (figure 19B) suite à la chromatographie de filtration sur gel révèle les mêmes résultats qu'avec les OPG radio-marqués sur les résidus de phosphoglycérol. De plus, les OPG synthétisés par les protéines MdoG mutantes et sauvage possèdent les mêmes taux de substitution.

b) Activité de synthèse des mutants de la protéine MdoH.

La séparation des OPG sur une colonne de filtration sur gel ne montre pas de différence (figure 21) : les OPG produits par les protéines mutantes sont élués de manière identique à ceux d'une souche sauvage. Par contre, la quantité d'OPG varie suivant la localisation de l'épitope (figure 22A). Pour les OPG marqués au glycérol tritié, trois insertions n'engendrent pas ou peu d'influence sur la production d'OPG : il s'agit des insertions R138, Y139 et M519. Les deux insertions R138 et Y139 se situent au bord du segment transmembranaire I, tandis que l'insertion M519 se situe dans le segment transmembranaire III (figure 14). Ces insertions d'épitope ne causent apparemment pas de mauvaises insertions de la protéine MdoH dans la membrane cytoplasmique.

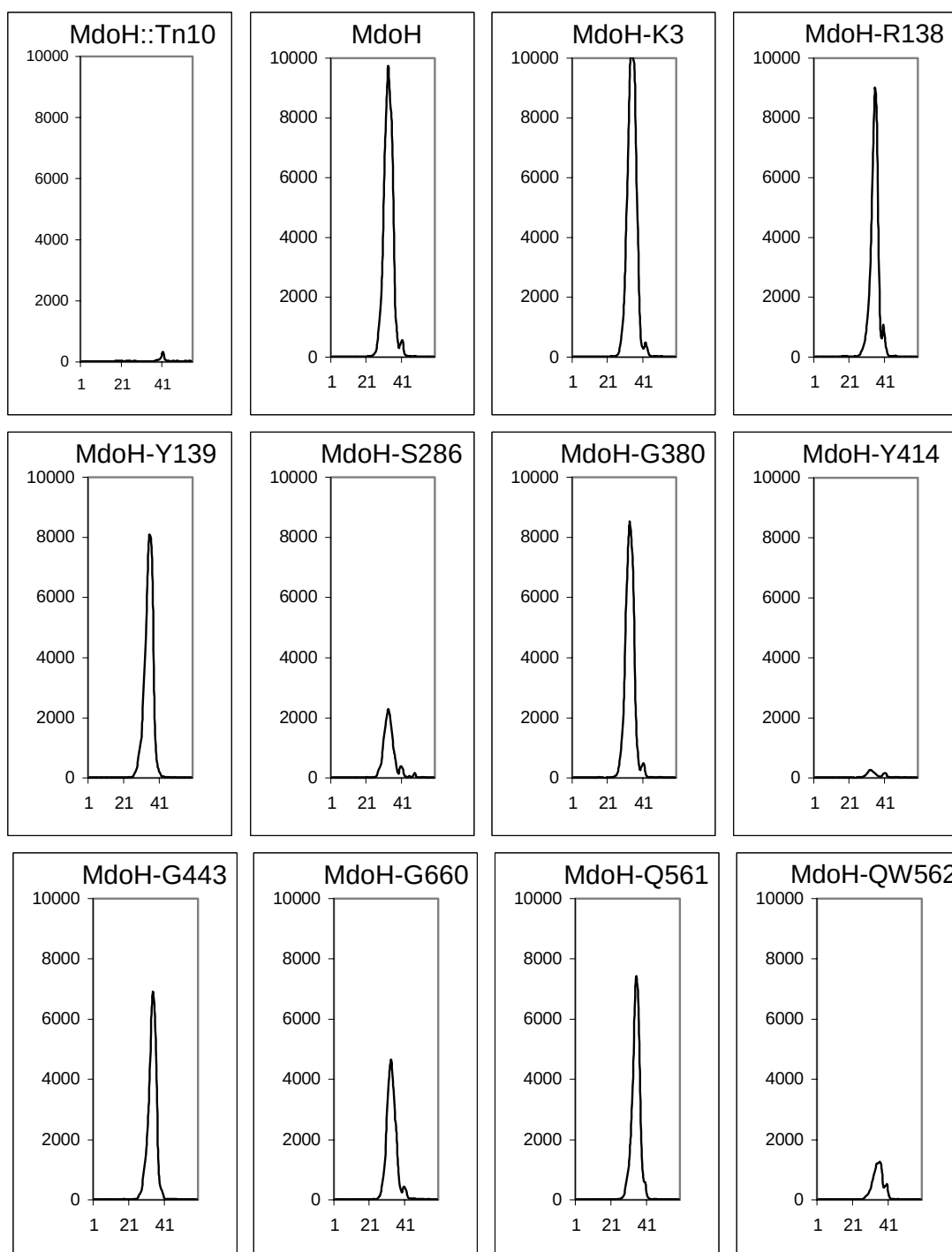


Figure 21 : Séparation des OPG produits par des protéines MdoH mutantes. La séparation a été effectuée sur une colonne de gel filtration. Les axes des ordonnées représentent la radioactivité (cpm) due au ($2\text{-}^3\text{H}$) glycérol. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

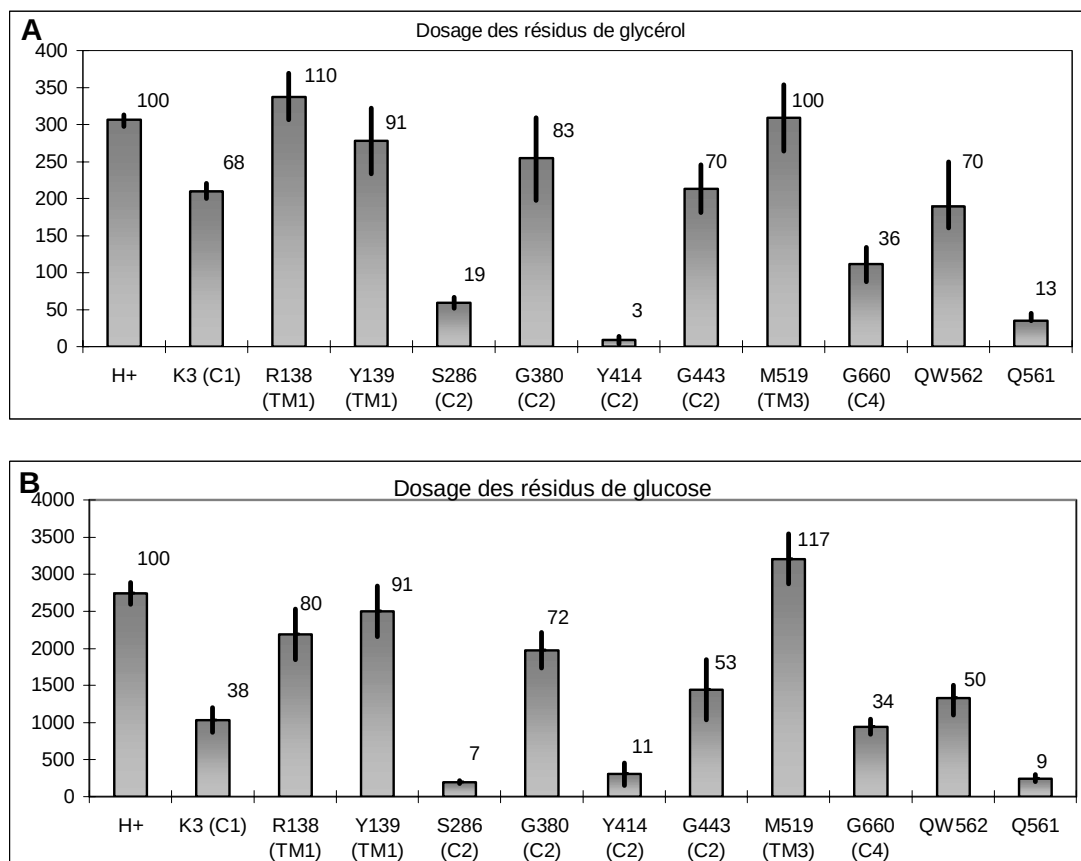
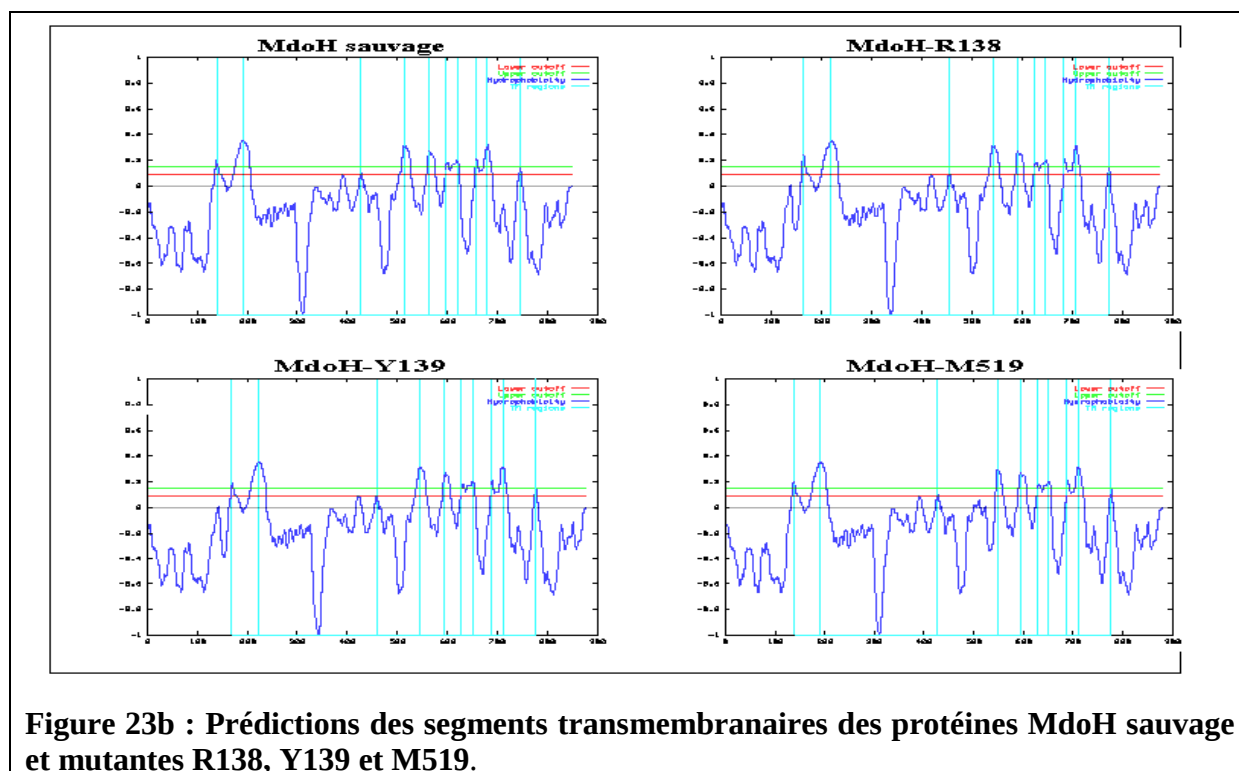
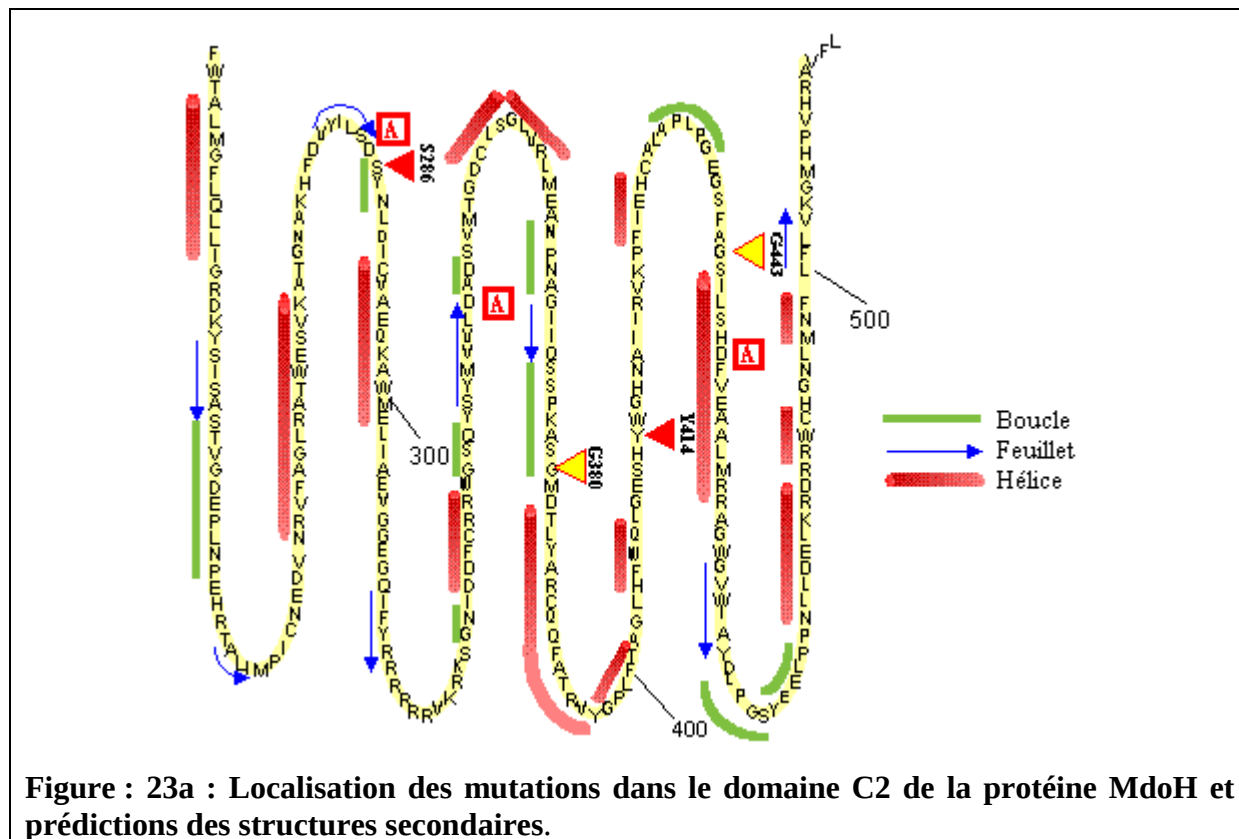


Figure 22 : Dosage des résidus de glycérol (A) et de glucose (B) dans les OPG produits à l'aide des protéines mutantes MdoH. Les chiffres représentent les pourcentages de biosynthèse des OPG dans une souche mutante par rapport à la souche sauvage. Les axes des ordonnées sont exprimés en nanomoles/mg de protéines.

Une analyse par le programme (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) TopPred2 de ces protéines prédit que la présence de l'épitope ne perturbe pas la prédiction des 8 segments transmembranaires par rapport à la protéine sauvage (figure 23b).

Trois insertions provoquent une diminution drastique de la production d'OPG : il s'agit des insertions S286, Y414, Q561. Les insertions S286 et Y414 (figure 23a) ont probablement interrompu un site actif localisé dans la parie C2 soupçonnée de renfermer les domaines catalytiques et de fixations de UDP-glucose ou de L'ACP (figure 14). L'insertion Q561 étant située dans la boucle périplasmique, nous pouvons supposer une mauvaise interaction entre les protéines MdoH et MdoG engendrant une diminution de la synthèse des OPG.

Les cinq insertions K3, G380, G443, QW562 et G660 engendrent une baisse significative de la quantité d'OPG (figure 21).



L'influence de l'insertion K3, (figure 14) située dans le domaine C1 N-terminal, sur la production d'OPG montre un rôle de cette région cytoplasmique. Mais, l'absence d'autre insertion dans cette région ne permet pas de déterminer le degré d'importance de cette région pour l'activité de la protéine MdoH.

Etant donnée l'influence importante des insertions S286 et Y414 sur la production d'OPG, nous pouvons supposer que l'insertion G380 soit située entre des domaines actifs (figure 23a).

Par contre, l'insertion QW562, situé au même endroit que l'insertion Q561, ne provoque qu'une faible influence par rapport à celle de Q561. L'interaction entre MdoG et MdoH-QW562 apparaît plus efficace qu'avec la protéine MdoH-Q561.

Ces résultats peuvent être le fait de la nature de l'épitope inséré qui ne diffère que par un acide aminé. La protéine MdoH- QW562 possède une lysine en place d'une serine par rapport à la protéine MdoH-Q561. L'apport d'une sérine au niveau de la boucle périsplasmique pourrait avoir un effet plus néfaste pour l'interaction entre les protéines MdoG et MdoH. Par contre, l'absence du tryptophane dans la protéine MdoH-QW562 ne semble pas perturber excessivement la biosynthèse des OPG.

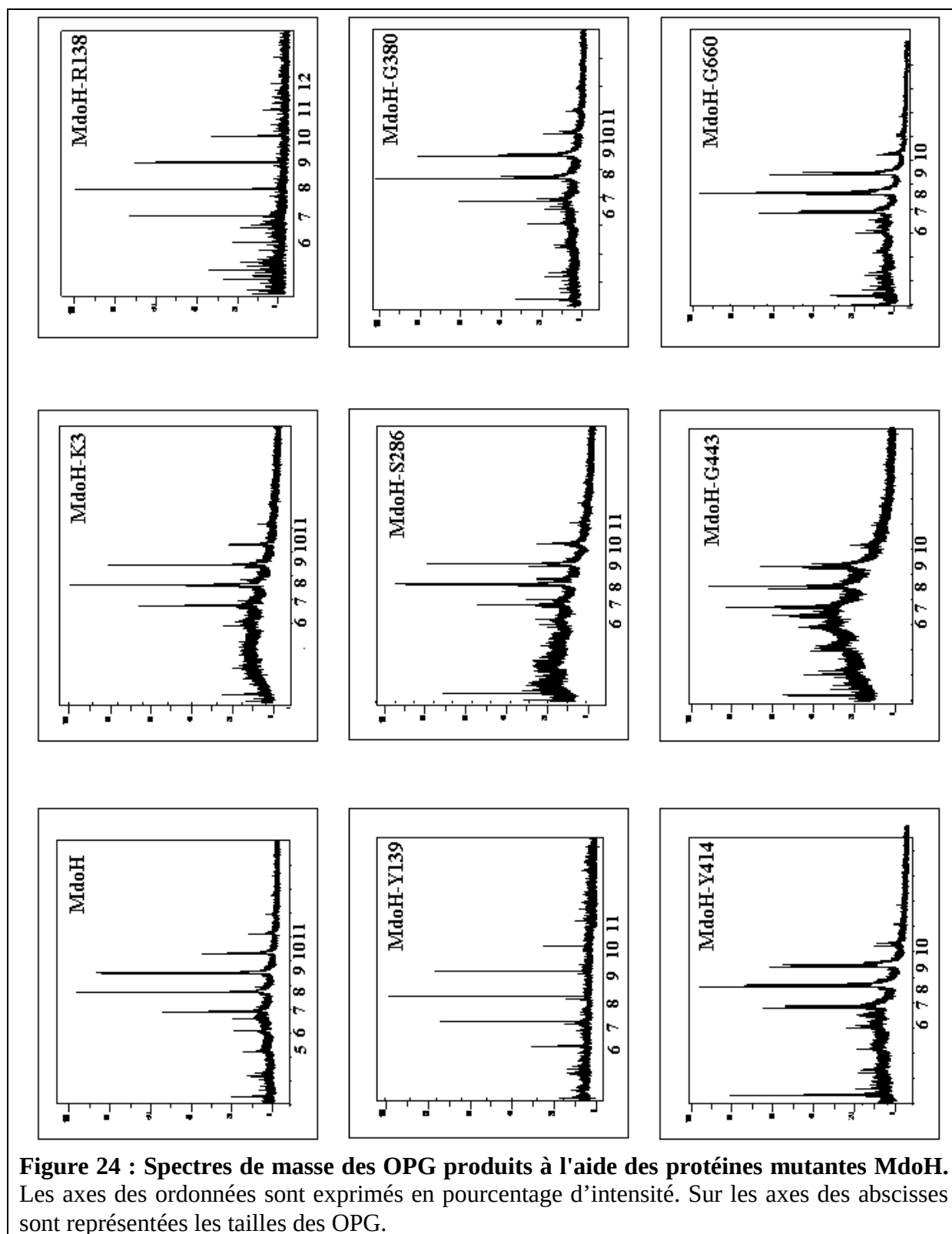
L'insertion G660 est située dans une boucle cytoplasmique très chargée avec 3 acides aspartiques, 1 acide glutamique et 3 arginines. L'épitope perturberait la structure de cette boucle cytoplasmique en modifiant la position de ces charges dans l'espace qui pourraient être nécessaires à l'activité de la protéine MdoH ou à sa mise en conformation dans la membrane cytoplasmique.

L'ensemble des résultats obtenus avec les OPG radio-marqués sur les résidus de phosphoglycérol est confirmé par le dosage du glucose (figure 22B) compris dans les fractions récupérées. De plus, les taux de substitution des OPG synthétisés par les protéines MdoH mutantes ou sauvage sont identiques.

Ces mutations permettent de révéler deux domaines actifs situés en N-terminal et C-terminal de la large partie centrale C2 et relié par une vingtaine d'acides aminés compris entre les positions 380 à 400 (figure 23a).

2) Analyses structurales des OPG.

Les OPG produits (voir Matériels et Méthodes) par les souches portant les différents allèles des protéines mutantes sur un plasmide multi-copies ont été analysés en spectrométrie de masse pour déterminer des changements éventuels dans la longueur du squelette glucosidique.



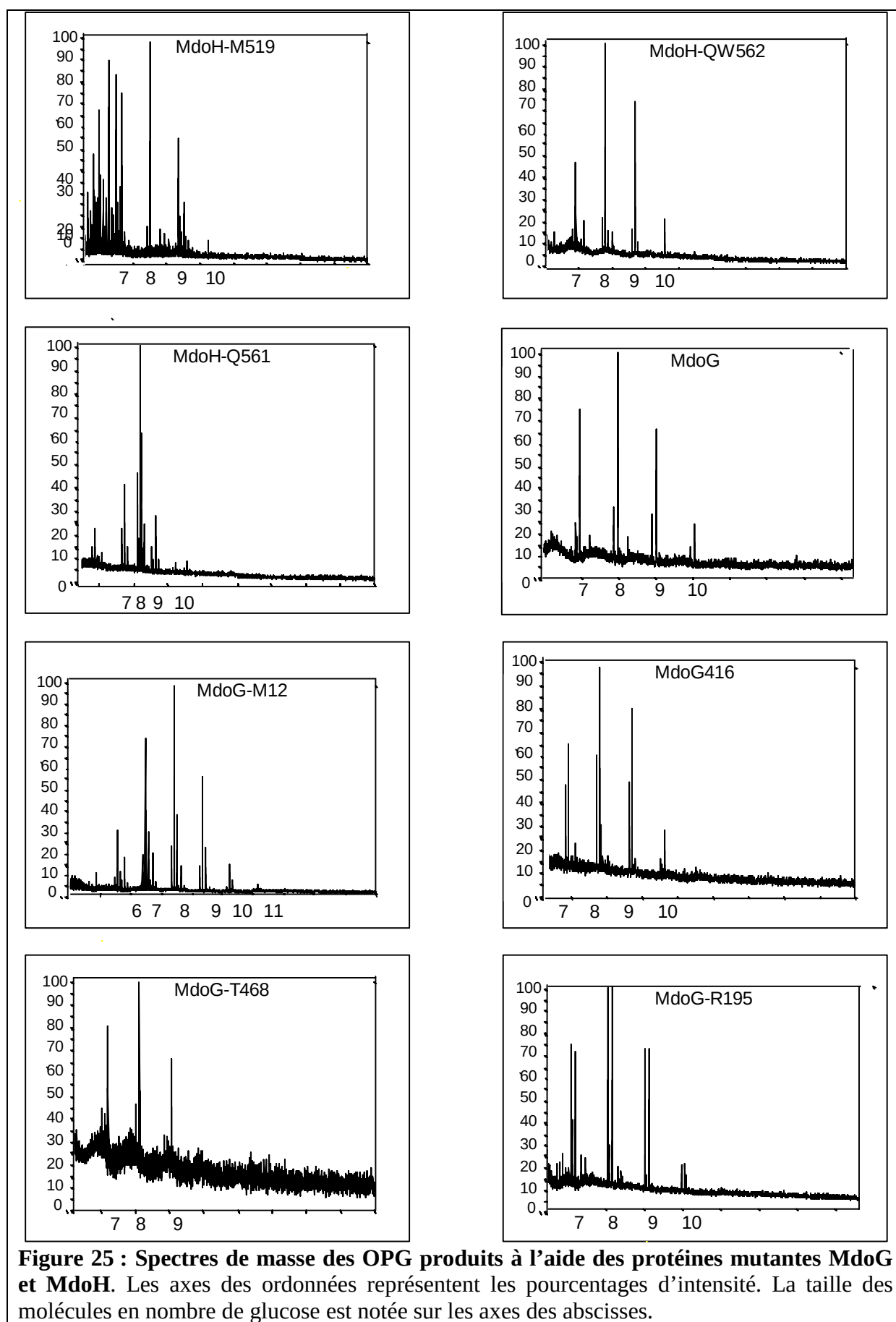


Figure 25 : Spectres de masse des OPG produits à l'aide des protéines mutantes MdoG et MdoH. Les axes des ordonnées représentent les pourcentages d'intensité. La taille des molécules en nombre de glucose est notée sur les axes des abscisses.

Les dérivés partiellement méthylés et acétylés des OPG ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse pour déterminer des changements éventuels de nature ou du taux de branchement des OPG.

a) Analyse des OPG en spectrométrie de masse.

Les OPG produits issus de souches portant les gènes *mdoG* ou *mdoH* sauvage sur un plasmide sont de taille identique à ceux produits par souche sauvage (*mdoGH* chromosomique). Nous observons une hétérogénéité de taille allant en moyenne de 6 à 13 résidus de glucoses. L'analyse des OPG produits par les différentes protéines mutantes ne montre pas de différences majeures par rapport à ceux produits par protéine sauvage (figure 24).

b) Analyse du branchement des squelettes glucosidiques.

Les OPG ont été partiellement méthylés, acétylés puis analysés par chromatographie en phase en gazeuse suivie d'une analyse des produits séparés en spectrométrie de masse.

Les OPG issues d'une souche sauvage possède une structure moyenne de 9 résidus de glucose par molécules. Ces molécules possèdent en moyenne 0,33 résidu de glucose réducteur ; 1,33 résidus de glucose non-réducteur liés uniquement en position 1 ; 1 résidu glucose interne lié en position 1 et 2 ; 0,33 résidus de glucose lié en position 1 et 6 ; et 1 résidu de glucose lié en position 1, 2, 6 représentant les points de branchement [Schneider et coll., 1979]. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence avec les OPG produits par les protéines sauvages ou mutantes codées par les différents allèles des gènes *mdoG* ou *mdoH* portés sur les plasmides multicopies.

La diminution de l'activité de la protéine MdoH ou de MdoG ne produit pas de changement dans la qualité de synthèse des OPG.

B) Influences de trois acides aspartiques conservés dans l'activité de la protéine MdoH.

La comparaison des profils d'amas hydrophobes (HCA) de la protéine MdoH avec les protéines des familles des glycosyltransférases, réalisés par B. Henrissat, a permis de mettre en évidence une organisation commune aux glycosyltransférases de type 2 dans le domaine C2 central de la protéine MdoH (figure 14). Ce domaine posséderait deux domaines A et B retrouvés dans les glycosyltransférases de la famille 2. Le domaine A des glycosyltransférases possède deux acides aspartiques conservés qui sont retrouvés dans la protéine MdoH et

correspondent aux acides aspartiques 285 et 346. Le domaine B, quant à lui, possède un seul acide aspartique conservé qui est retrouvé dans la protéine MdoH et correspond à l'acide aspartique 449.

I) Génération des mutations ponctuelles.

Les mutations ponctuelles par conversion d'un acide aspartique par une alanine ont été réalisées par hybridation d'un oligonucléotide sur de l'ADN simple brin contenant des bases uracile en place des bases thymine selon la méthode de Kunkel [Kunkel, 1985] (voir Matériels et Méthodes).

La synthèse du brin complémentaire s'est effectuée *in vitro* en présence des quatre didésoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dTTP et dGTP). Les plasmides résultants sont utilisés pour transformer une souche *ung*⁺, *hsdR* (voir Matériels et Méthodes). La mutagenèse étant effectuée sur un fragment *SacII-SmaI* (pNF586) de 2,4 kb, un fragment *AgeI* de 0,5 kb a été sous cloné dans le vecteur pUC18 pour vérifier par séquençage la présence des mutations ponctuelles en position 285 et 346. La mutation en position 449 a été vérifiée directement sur vecteur pNF586 ayant subis la mutagenèse dirigée. Le plasmide a été entièrement séquencé.

Le fragment *AgeI* du plasmide pNF586 muté ponctuellement en position 285 ou 346 a ensuite été cloné dans le vecteur pNF309 en place du fragment *AgeI* sauvage. Une vérification de l'insertion correcte a été vérifiée par les enzymes de restriction *EcoRV* et *AgeI*. Le fragment *MluI-BssHII* du plasmide pNF586 muté en position 449 a été cloné dans le plasmide pNF581 en place du fragment sauvage.

Puis le fragment *MluI-XbaI* du plasmide pNF581 muté en position 449 a été rendu bout franc et cloné dans le site *EcoRV* du vecteur pYZ4 et orienté dans le même sens que le promoteur *placUV5*.

II) Analyse de l'activité de synthèse des trois protéines mutantes.

La souche NFB1990 a été transformée par chacun des plasmides portant une mutation ponctuelle. Un marquage radioactif des OPG à l'aide du glycérol tritié a été effectué lors d'une culture de 20 ml (voir Matériels et Méthodes). Les OPG ont été extraits et purifiés sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-25. La radioactivité mesurée est semblable à celle d'une souche *mdoH::Tn10* portant le vecteur pYZ4. IL n'y a donc pas d'incorporation de résidu de phosphoglycérol dans les OPG pour les protéines mutées sur un des acides aspartiques 285, 346 ou 449 (figure 26).

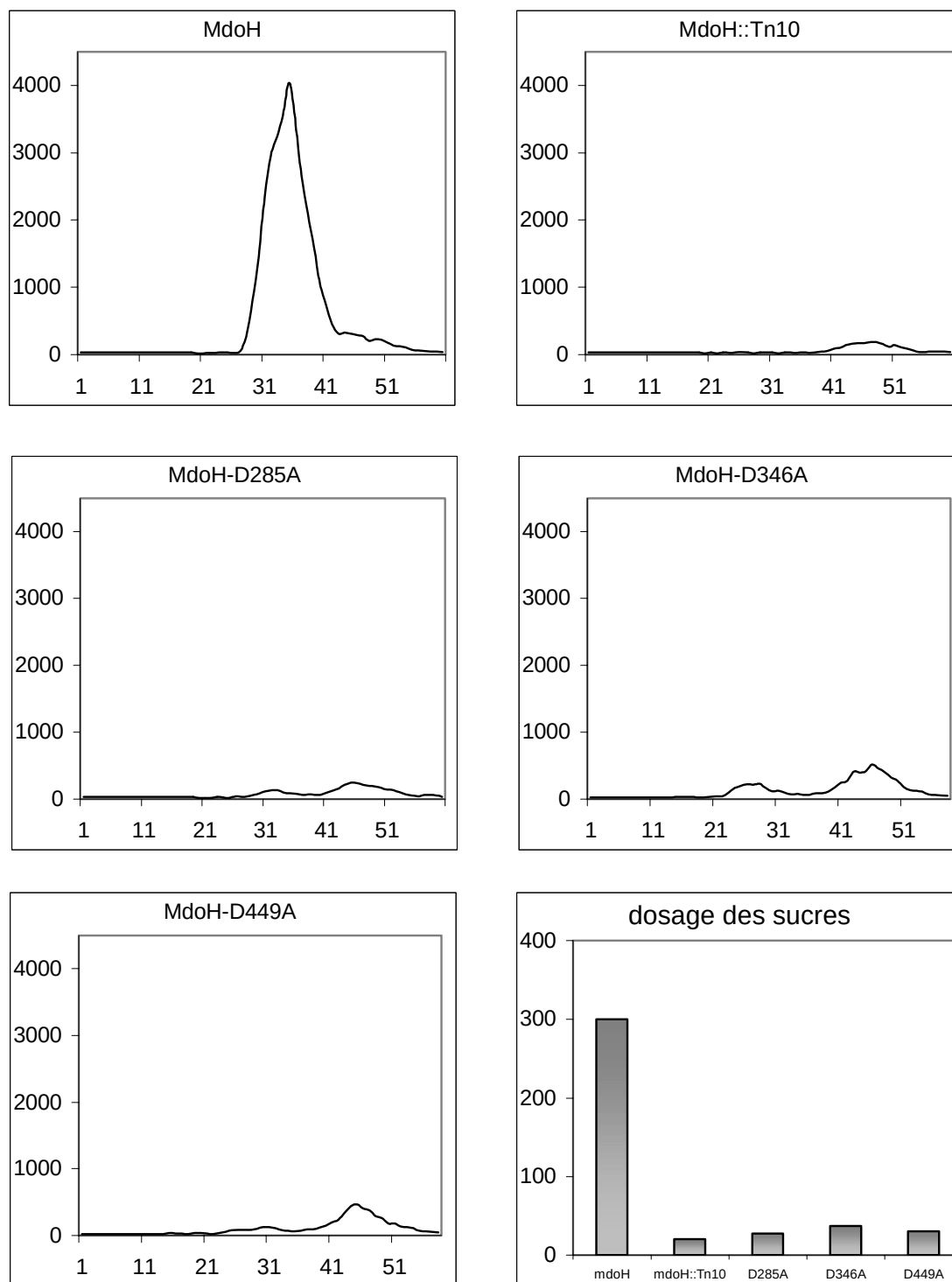


Figure 26 : Purification des OPG issus des souches portant les allèles mutants des protéines MdoH mutées ponctuellement. La purification des OPG marqués sur les résidus de glycérol (radioactivité est exprimée en cpm sur les axes des ordonnées) a été réalisée sur colonne de filtration sur gel. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses. Les dosages des sucres (la quantité de glucose est exprimée en μg sur l'axe des ordonnées) ont été réalisés les fractions renfermant les OPG.

Les fractions correspondantes aux OPG ont été récupérées, concentrées et un dosage du glucose a été réalisé pour déterminer la présence éventuelle d'OPG neutres. Les résultats sont identiques à ceux révélés par le marquage radioactif. La quantité de sucre est semblable à celle mesurée dans la souche ne produisant pas d'OPG. Les protéines MdoH mutées dans l'un de ces trois acides aspartiques sont incapables de synthétiser des OPG.

Ces analyses révèlent la nécessité absolue de ces acides aspartiques 285 346 et 449 pour l'activité de la protéine MdoH. Nous pouvons remarquer que l'acide aspartique 285 est situé à proximité de l'insertion d'épitope EP31*Bam*HI S286 qui engendre une diminution drastique de l'activité de synthèse des OPG. Ceci confirme la présence d'un domaine actif dans cette région (figure 23a).

Par contre, l'insertion G443 n'a pas provoqué de diminution importante de la biosynthèse des OPG malgré la localisation très proche de l'acide aminé D449. L'épitope n'a apparemment pas modifié la conformation de ce site actif.

Partie 2 : Etude du gène *MDOD*, paralogue du gène *MDOG*.

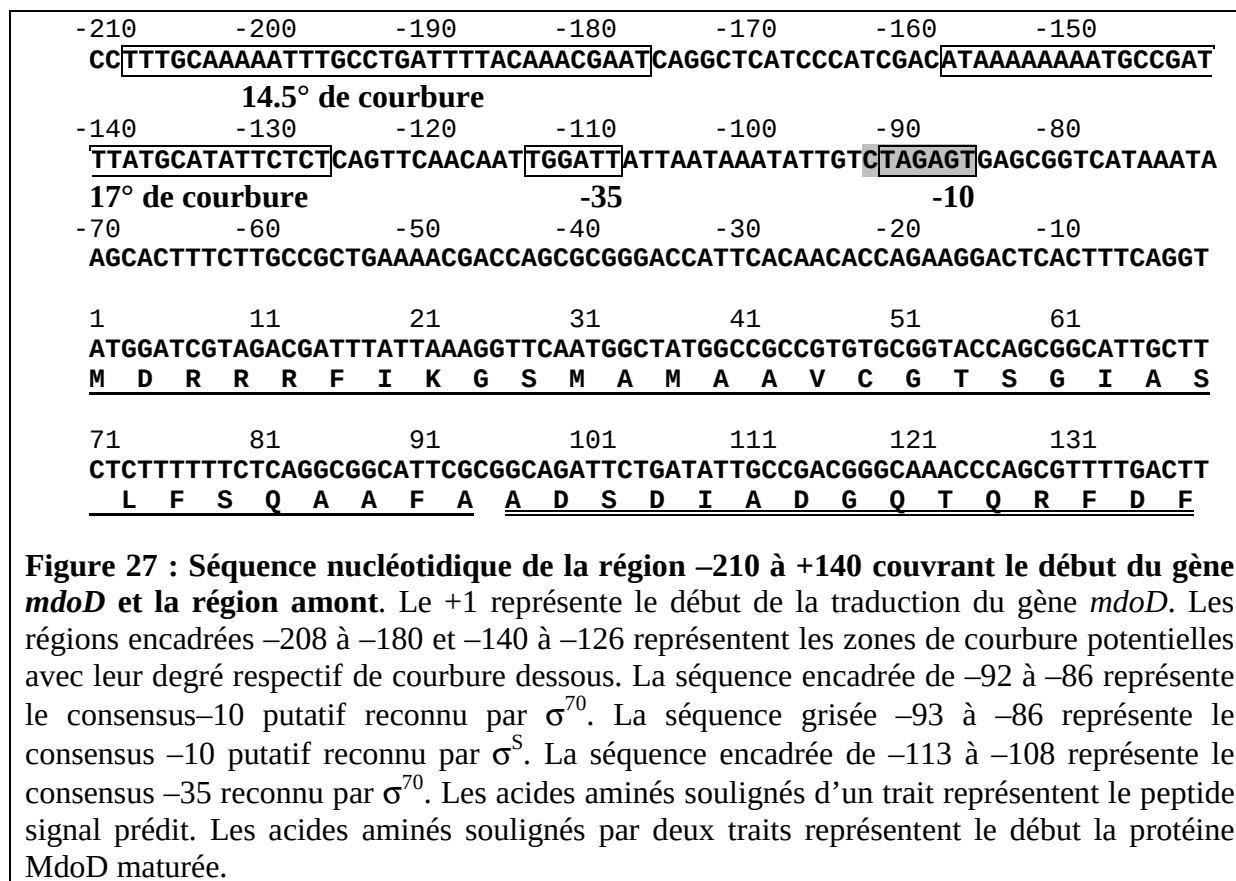
A) Caractéristiques génomiques du gène *MDOD*.

L'obtention de mutations dans les gènes responsables de la biosynthèse des OPG chez *E. coli* nécessite un travail important du fait de l'absence de sélections et de cribles simples traduisant l'absence d'OPG. Le premier mutant spontané, nommé *mdoA1*, a été identifié et est affecté dans la biosynthèse de la chaîne glucosidique [Bohin et coll., 1984b]. Le locus *mdoA* a été cloné et est constitué de deux gènes organisés en opéron *mdoGH* [Lacroix et coll., 1991]. La mutation *mdoA1* a été localisée dans le gène *mdoH* qui est responsable de l'activité glucosyltransférase catalysant la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2. Une mutation dans le gène *mdoG* a été obtenue par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine provoquant une mutation nulle non polaire dans le gène *mdoG*. Cet allèle *mdoG216::neo* entraîne l'absence de biosynthèse des OPG.

Plusieurs tentatives de mutagenèse par transposon ou à l'aide de produits chimiques mutagènes ont été réalisées pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse du squelette glucosidique des OPG. Aucun nouveau gène n'a pu être mis en évidence par ces méthodes. Les seuls mutants ont été localisés dans des locus déjà identifiés : *mdoGH* et *galU*.

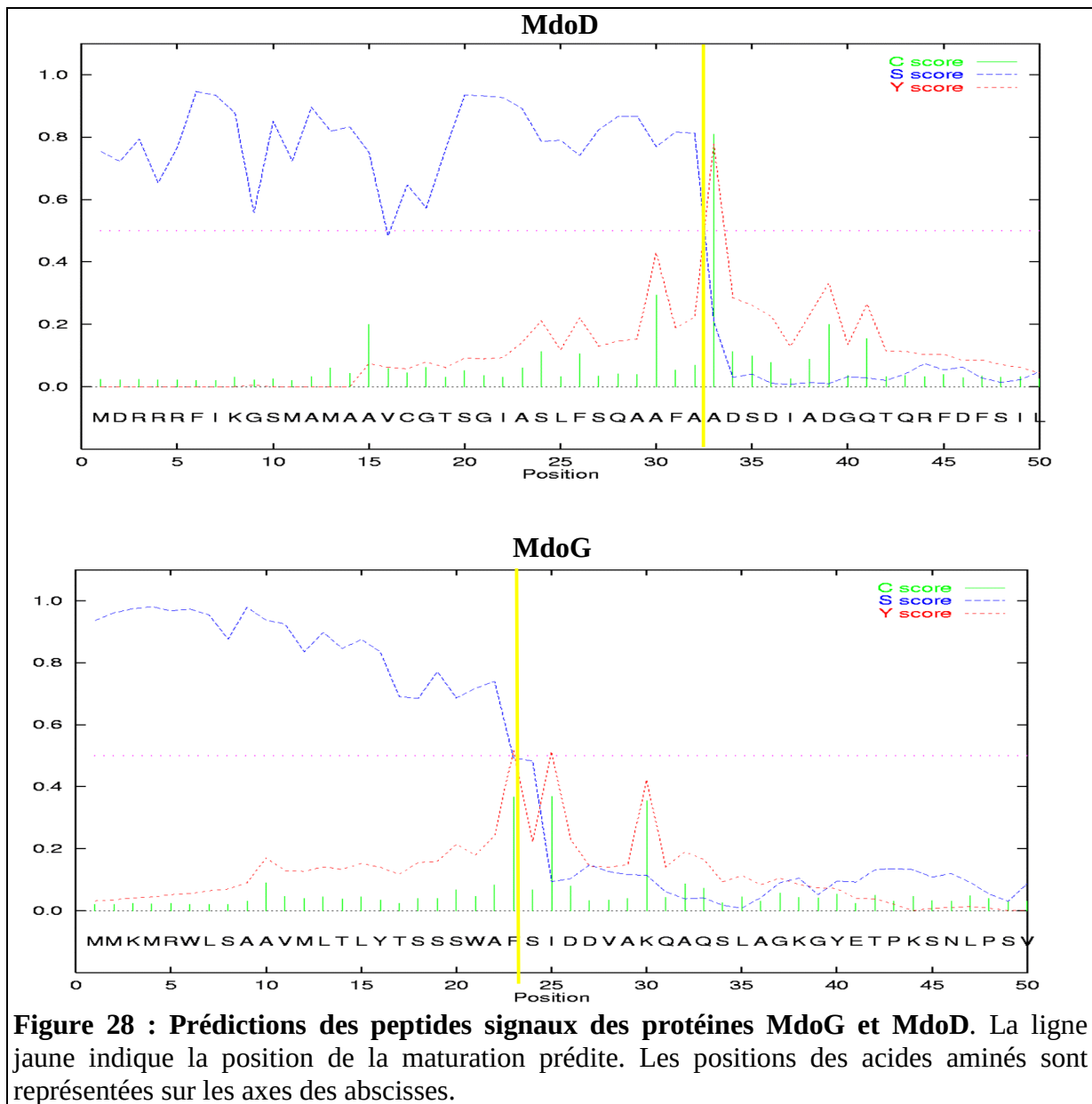
La publication de la séquence du génome d'*E. coli* nous a permis d'aborder une approche génomique pour identifier un nouveau gène impliqué dans la biosynthèse des OPG.

Nous avons donc comparé les séquences protéiques des gènes *mdoG*, *mdoH*, *mdoB* et *mdoC* avec les ORF déduites du génome d'*E. coli*. La comparaison a révélé l'existence de la protéine putative YdcG, qui présente 35 % d'acides aminés identiques et 50% de semblables avec la protéine MdoG (Infobiogen 24/01/2002). Des gènes paralogues sont définis comme possédant au moins 30% d'acides aminés identiques sur 60% de la longueur des protéines [Blattner et coll., 1997]. Nous pouvons conclure que l'ORF *ycdG* et le gène *mdoG* sont des gènes paralogues. Nous avons nommé cette ORF *mdoD*. Le gène *mdoD* est situé à 32,2 min sur le chromosome d'*E. coli*, soit aux coordonnées nucléotidiques 1494880-1496535 [Blattner et coll., 1997]. Deux codons d'initiation ATG possibles ont été localisés aux nucléotides +1 et +31 (figure 27). Le codon d'initiation situé au nucléotide +1 semble le plus probable car il est précédé d'une séquence putative de fixation du ribosome AGGA située entre les nucléotides -14 et -17.



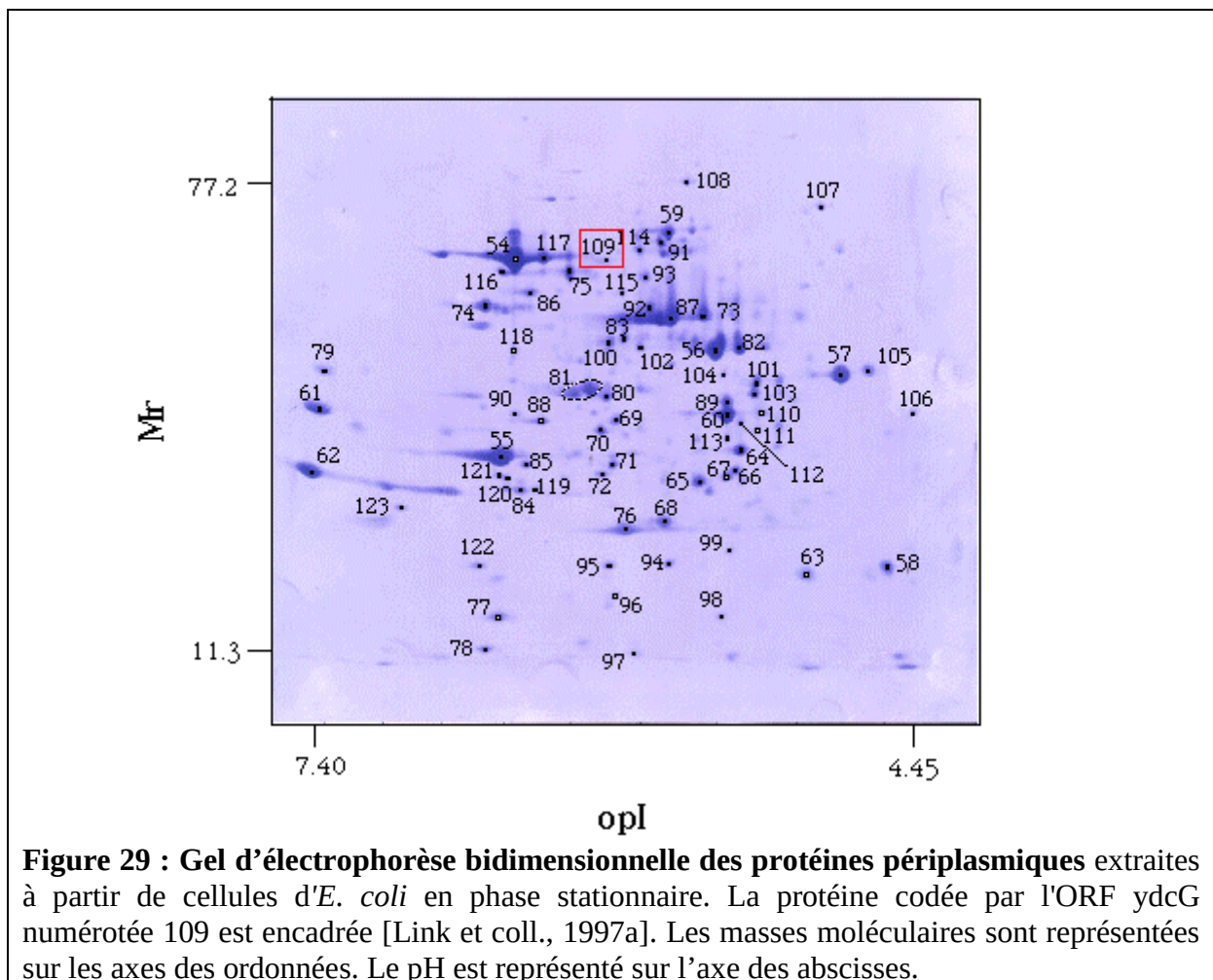
A partir de cet ATG, le gène *mdoD* est formé de 1653 paires de bases et code un polypeptide de 551 acides aminés. Un promoteur reconnu par le facteur σ^{70} est prédit (Genbank) entre les nucléotides 1494766 et 1494794. La séquence consensus -35 est TTGGAT et la séquence consensus –10 est TAGAGT (figure 27).

L'analyse de la séquence protéique MdoD par le programme SignalP V1,1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/output.htm>) prédit un peptide signal de 32 acides aminés avec des scores C de 0,809 (site de clivage), S de 0,946 (score de la séquence signal) et Y de 0,775 (score combiné entre les scores C et S) qui sont meilleurs que ceux prédits pour la protéine périplasmique MdoG (score C de 0,368, score S de 0,981, score Y de 0,517) (figure 28). De plus, la protéine MdoD a été visualisée sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle réalisé à partir d'extraits périplasmiques (figure 29) [Link et coll., 1997a]. Les premiers acides aminés séquencés correspondent à la protéine MdoD dépourvue des 32 premiers acides aminés. La prédiction d'un peptide signal de 32 acides aminés est donc confirmée par les résultats de Link et coll. Le poids moléculaire calculé de la protéine mature est alors de 59,443 kda.



La protéine MdoD a été visualisée sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle à partir d'extraits périsplasmiques provenant de cellules en phase stationnaire. Par conséquent, nous avons recherché des séquences consensus reconnues par le facteur σ^S [Espinosa-Urgel et coll., 1996]. Une séquence -10 putative CTAGAGT a été localisée entre les nucléotides 1494788 et 1494794 (figure 26). Cette séquence -10 identifiée possède les quatre nucléotides les plus conservés dans les promoteurs reconnus par le facteur σ^S , et en particulier le nucléotide C -13 qui apparaît être important pour la reconnaissance du promoteur par le facteur σ^S . Deux zones de courbure potentielles ont été identifiées par le programme DNAProp (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/DNAProp/>) ; Elles sont situées entre les nucléotides -126 et -140 puis entre les nucléotides -186 et -208. Ces deux séquences

possèdent respectivement des degrés de courbure de 17,5° et 14,5°. Le gène *mdoD* semble partagé des éléments avec des gènes reconnus par le facteur σ^S .



B) Influence de gène *MDOD* sur la structure des OPG.

I) Inactivation du gène *mdoD*.

1) Clonage du gène *mdoD*.

Le gène *mdoD* a été cloné à partir du phage lambda 1A16 de la banque de Kohara (1987) [Kohara et coll., 1987]. L'ADN du phage lambda 1A6 et le plasmide pUC18 ont été digérés par l'enzyme de restriction *SalI*, mélangés et raboutés par l'ADN-ligase du phage T4. Les cellules NFB702 ont été transformées par ce mélange de ligation. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu LB gélosé contenant de l'ampicilline, du Xgal et de l'IPTG.

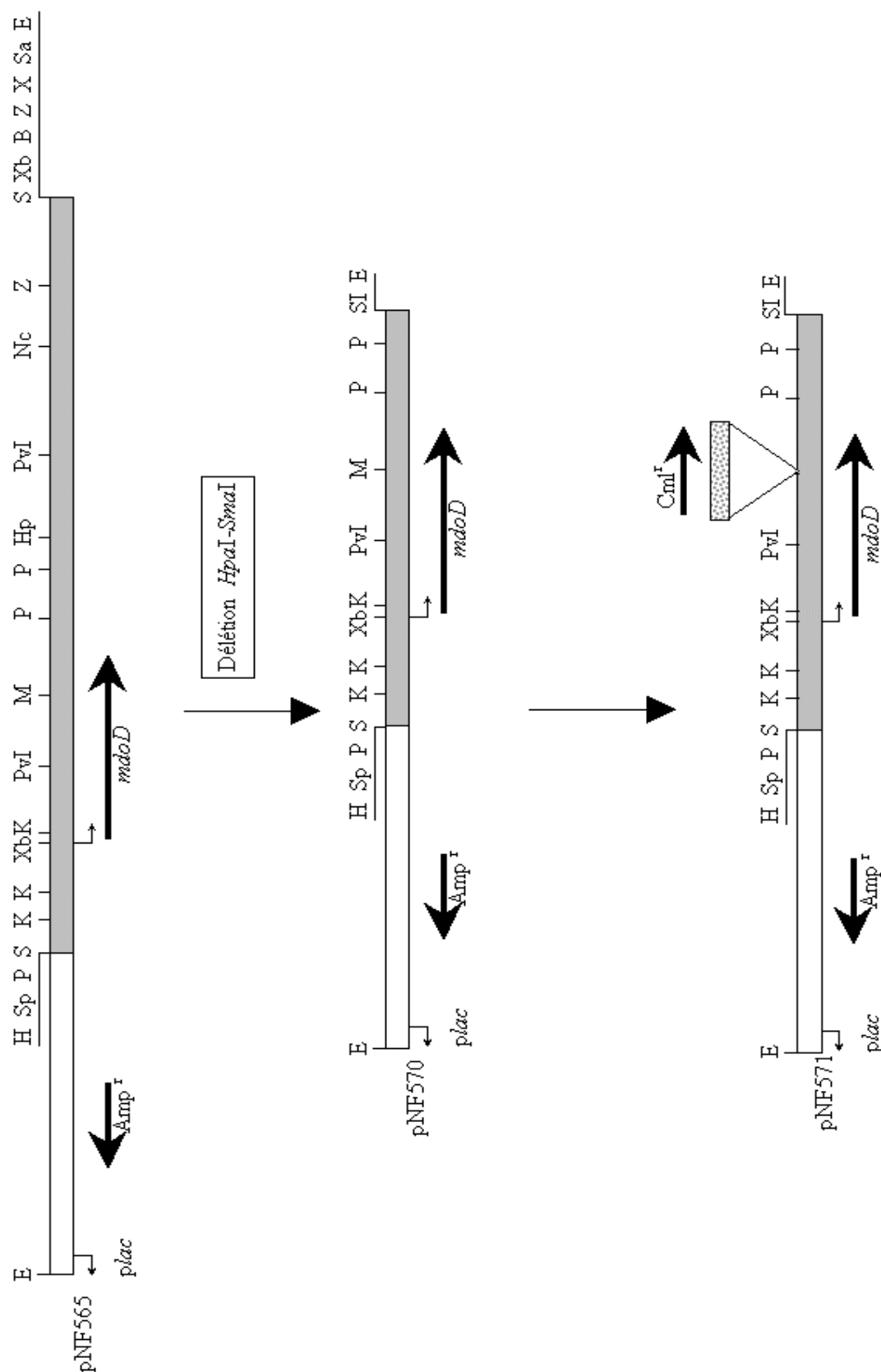


Figure 30 : Clonage et inactivation du gène *mdoD*. BamHI; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluI*; P, *PstI*; S, *Sall*; Sp, *SphI*; SI, *SacI*; SII, *SacII*; V, *EcoRV*; Xb, *XbaI*; Z, *SmaI*; PvI, *PvuI*; Hp, *HpaI*; N, *NcoI*.

Les clones blancs ont été récupérés et leurs plasmides ont été extraits et digérés par l'enzyme de restriction *Sma*I, dont un site se trouve dans le multi-sites de clonage et un second dans l'insert. 3 clones sur 33 présentaient les bandes attendues à 8,9 kb et à 0,7 kb (Figure 30). Une seconde vérification, par une double digestion avec les enzymes de restriction *Eco*RI et *Xho*I, a permis de confirmer la présence de l'insert désiré, ainsi que son orientation (pNF565).

2) Insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol dans le gène *mdoD*.

Tout d'abord, une délétion de 3,1 kb a été effectuée pour rendre le site *Mlu*I unique dans la phase codante du gène *mdoD* (Figure 30). Pour cela, le plasmide pNF565 a été digéré par les enzymes de restriction *Hpa*I et *Sma*I, et rabouté par l'ADN-ligase de T4.

La vérification de la délétion du plasmide pNF565 a été réalisée par deux digestions grâce aux enzymes *Pst*I et *Xba*I. Le plasmide pNF570 obtenu contient un insert de 3,8 kb portant le gène *mdoD*.

Le plasmide pBR328 comportant le gène de la résistance au chloramphénicol bordé par deux sites de restriction *Sfu*I et le plasmide pNF570 ont été digérés respectivement par les enzymes de restriction *Sfu*I et *Mlu*I. Leurs extrémités cohésives incompatibles ont été bouchées séparément grâce au fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I en présence de dCTP et de dGTP. Les produits ont été mélangés, et raboutés grâce à l'ADN-ligase de T4. Puis une digestion du site de restriction reconnu par l'enzyme *Eco*RV, présent uniquement dans le plasmide pBR328 et en dehors de la cassette de résistance au chloramphénicol, permet d'éliminer les vecteurs pBR328 restants. Ce mélange de ligation a été utilisé pour transformer la souche NFB702. Les clones ont été sélectionnés sur un milieu LB supplémenté en chloramphénicol. Les clones obtenus ont été testés pour leur résistance à l'ampicilline et leur sensibilité à la tétracycline, afin d'éliminer les clones portant les plasmides pBR328 résistants aux trois antibiotiques. Les clones résistants au chloramphénicol, à l'ampicilline, et sensibles à la tétracycline ont été récupérés. Une coupure par les enzymes de restriction *Eco*RI/*Hind*III des plasmides extraits des clones ci-dessus a permis de vérifier la présence de la cassette de résistance au chloramphénicol (pNF571). L'allèle du gène *mdoD* portant la cassette de résistance au chloramphénicol au site *Mlu*I a été nommé *mdoD217::cml*.

3) Insertion de l'allèle *mdoD217::cml* sur le chromosome d'*E. coli*.

Le plasmide pNF571 linéarisé par l'enzyme *Eco*RI a été utilisé pour transformer la souche JC7623 (*recB*, *recC*, *sbcBC*) qui permet l'échange d'allèle entre un plasmide linéarisé

et le chromosome.

Les clones ont été sélectionnés sur des boîtes contenant du chloramphénicol. Les clones recombinants, résistants au chloramphénicol, ont été identifiés en testant leur sensibilité à l'ampicilline attestant de la perte du plasmide pNF571 et de la recombinaison entre le chromosome et le plasmide. Ces clones ont été utilisés pour effectuer un lysat du phage P1 transducteur. Ce lysat a été employé pour transduire la mutation *mdoD217::cml* dans un contexte génétique désiré. Le fragment chromosomique *Sall-Sall* contenant l'allèle *mdoD217::cml* a été cloné pour vérifier l'insertion correcte de l'allèle *mdoD217::cml* en place du gène *mdoD*.

II) La mutation *mdoD217::cml* augmente l'hétérogénéité des OPG.

1) Purification et dosage des OPG produits par la souche *mdoD217::cml*.

Les OPG des souches DF214 (*pgi*, *zwf*) et NFB1925 (*pgi*, *zwf*, *mdoD217::cml*) ont été marqués spécifiquement sur le glucose par l'incorporation de (U-¹⁴C) glucose. Les OPG ont été extraits et purifiés sur une colonne de filtration sur gel (voir Matériels et Méthodes). La quantité d'OPG mesurée dans les deux souches n'a pas révélé de différence significative. La souche sauvage renferme 192,4 nmol de glucose dans les OPG/mg de protéine et la souche mutante NFB1925 200 nmol de glucose dans les OPG/mg de protéine. Par contre, le profil d'élution des OPG sur la colonne de filtration sur gel montre une sortie prématurée des OPG provenant de la souche mutante avec un décalage de 8 fractions par rapport à la souche sauvage (figure 31).

Un marquage des OPG à l'aide du 2-³H glycérol montre aussi une sortie prématurée des OPG provenant de la souche mutante avec un décalage de 7 fractions. Les pics d'élution des deux marquages se superposent pour les OPG provenant de la souche sauvage. Par contre les pics correspondant aux OPG extraits de la souche NFB1925 marqués sur le glucose et sur le glycérol semblent chevauchants.

La mutation *mdoD217::cml* semble provoquée une augmentation de la taille apparente des OPG et une répartition différente du phosphoglycérol sur le squelette glucosidique.

Néanmoins, le rapport glycérol/glucose reste identique dans la souche sauvage et la souche *mdoD217::cml*.

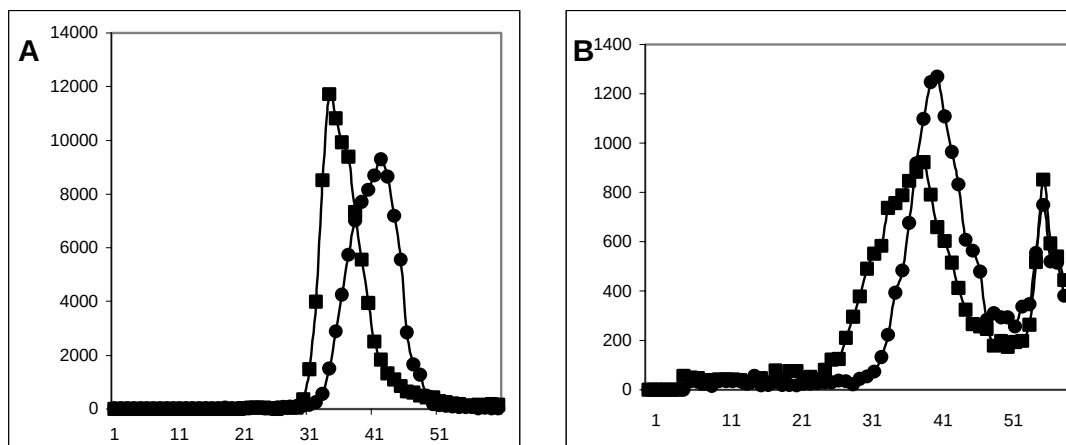


Figure 31 : Séparation des OPG extraits de la souche *mdoD217::cml*. Les OPG de la souche sauvage (cercle plein) et de la souche *mdoD217::cml* (carré plein) ont été radio marqués avec du (U-¹⁴C) glucose (A) ou du 2-³H glycérol (B) et séparés sur une colonne de filtration sur gel. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses. Les axes des ordonnées sont gradués en cpm.

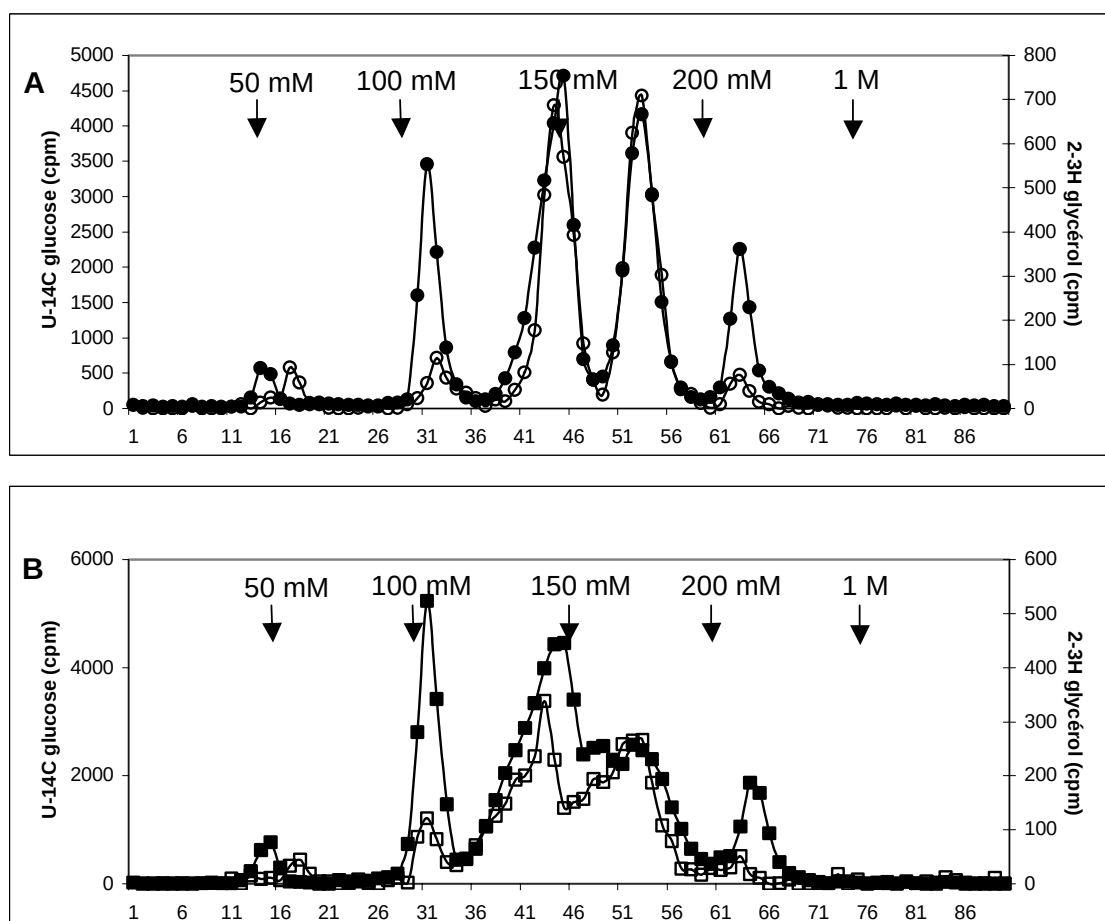


Figure 32 : Caractéristiques anioniques des OPG extraits de la souche *mdoD217::cml*. Les OPG extraits de la souche DF214 (A) et de la souche NFB1925 (B) ont été radio-marqués avec du (U-¹⁴C) glucose (symbole plein) ou du 2-³H glycérol (symbole vide) et élués sur une colonne d'échange d'anions. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses. La radioactivité due au (U-¹⁴C) glucose est représentée sur les axes des ordonnées de gauche et celle due au (2-³H) glycérol sur les axes des ordonnées de droite.

2) Mesure du caractère anionique des OPG produits par la souche *mdoD217::cml*.

Le caractère anionique des OPG a été analysé sur une colonne d'échange d'anion (DEAE Sephacel) à pH 7,4 éluée par des tampons Tris HCl pH 7,4 contenant des concentrations croissantes de NaCl (voir Matériels et Méthodes). A ce pH, seul les résidus de phosphoglycérol et de succinate confèrent le caractère anionique des OPG. Les OPG marqués par le (U-¹⁴C) glucose et produits par une souche sauvage sont divisés en 5 pics distincts. Le pic I n'est pas retenu sur la colonne (figure 32A), il est élué par le tampon Tris HCl pH 7,4 ne contenant pas de NaCl et représente les OPG neutres (1 à 2%). Les pics II à V sont élués par des concentrations croissantes de NaCl et correspondent aux OPG de caractère anionique. Les pics II à V correspondent à des OPG, dont le rapport charge sur masse est croissant, représentent respectivement 15%, 40%, 35% et 10% des OPG totaux. La présence des différents pics est due à la fois au niveau de substitution différent et à l'hétérogénéité en taille du squelette glucosidique. L'analyse des OPG marqués à l'aide du 2-³H glycérol révèle la présence de glycérol dans les pics II à V avec une faible représentation dans le pic II. Le pic I est en décalage avec celui observé dans le marquage sur des résidus de glucose. Ces produits doivent être dus à la contamination du (2-³H) glycérol.

Les mêmes analyses ont été réalisées à partir des OPG produits par la souche NFB1925 (*mdoD217::cml*) et marqués par le (U-¹⁴C) glucose.

Les proportions des pics I (2%) et V (10%) sont identiques à celles des pics I et V du profil des OPG issus de la souche sauvage (figure 32B). La proportion du pic II (18%) du profil des OPG provenant de la souche NFB1925 augmente par rapport à celle du pic II (15%) du profil des OPG provenant de la souche sauvage. Les différences majeures se situent au niveau des pics III et IV qui ne sont plus distinctement séparés comme sur le profil des OPG provenant de la souche sauvage et forment un pic d'allure complexe. La proportion du pic complexe (72%) est sensiblement inférieure à la somme des proportions des pics III (40%) et IV (35%) du profil des OPG provenant de la sauvage. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des OPG marqués à l'aide du 2-³H glycérol produits par la souche NFB1925. La présence d'un pic complexe dans une souche mutante *mdoD217::cml* suggère l'apparition de nouvelles espèces d'OPG avec des rapports charge sur masse distincts de ceux des OPG provenant d'une souche sauvage.

Ces analyses montrent une augmentation de l'hétérogénéité des OPG dans une souche

mdoD217::cml. La sortie prématurée sur la colonne de filtration sur gel et l'augmentation de l'hétérogénéité sur une colonne d'échange d'anions des OPG provenant de la souche NFB1925 suggère une modification de la structure du squelette glucosidique engendrant indirectement des rapports charge sur masse différents dans les populations de molécules d'OPG présentes dans les pics III à IV.

3) Mesure de la taille du squelette glucosidique des OPG produits par la souche *mdoD217::cml*.

Les OPG ont été désubstitués par deux traitements successifs : un traitement alcalin pour éliminer les liaisons éthers (résidus de succinate) et un traitement avec un acide fort (HF) pour éliminer les liaisons phosphodiester (résidus de phosphoglycérol et de phosphoéthanolamine). Le squelette glucosidique a ensuite été analysé en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) afin de déterminer la taille des chaînes glucosidiques.

Les molécules des OPG produites par une souche sauvage sont représentées par 8 types de squelette glucosidique allant de 6 à 13 résidus de glucose par molécule (figure 33A).

Par contre, les molécules d'OPG produites par la souche *mdoD217::cml* comportent 17 types de squelette glucosidique allant de 7 à 23 résidus de glucose par molécule (figure 33B). De plus, les espèces majoritaires subissent un léger décalage vers des molécules plus grandes. Ainsi, les espèces majoritaires pour les OPG provenant de la souche sauvage sont constituées de molécules de 8 à 9 résidus de glucose ; tandis que les espèces majoritaires sont représentées par des molécules de 9 et 10 résidus de glucose pour les OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*.

Cette analyse confirme l'hypothèse que l'inactivation du gène *mdoD* augmente l'hétérogénéité des OPG en influençant directement la taille du squelette glucosidique.

4) Mesure du taux de branchement des OPG produit par la souche *mdoD217::cml*.

La mesure des taux de branchement des OPG produits par la souche sauvage et la souche *mdoD217::cml* a été réalisée par l'analyse des dérivés partiellement méthylés et acétylés des OPG désubstitués.

Une molécule moyenne d'OPG (figure 33CD) de 9 résidus de glucose produits par la souche sauvage est formée de 0,33 résidus de glucose réducteur ; 1,33 résidus de glucose non-réducteur liés uniquement en position 1 ; 1 résidu glucose interne lié en position 1 et 2 ; 0,33 résidus de glucose lié en position 1 et 6 ; et 1 résidu de glucose lié en position 1, 2, 6 représentant les points de branchement [Schneider et coll., 1979]. L'analyse des dérivés partiellement méthylés et actétylés des OPG désubstitués produits par la souche *mdoD217::cml* révèle une distribution différente : 0,2 résidus de glucose réducteur ; 1,5 résidus de glucose non-réducteurs liés uniquement en position 1 ; 2 résidus de glucose internes liés en position 1 et 2 ; 0,2 résidus de glucose lié en position 1 et 6 ; et 1 résidu de glucose lié en position 1, 2, 6 représentant les points de branchement. Les points de branchement ont été ramenés arbitrairement à 1 pour comparer les résultats. Les résidus de glucose liés en position 1 et 2 sont deux fois plus représentés que les points de branchement dans les OPG provenant de la souche *mdoD217::cml* alors que ces deux espèces de résidus de glucose sont en quantité équivalente dans les OPG provenant de la souche sauvage. Les proportions des résidus de glucose non-réducteurs et des points de branchement diminuent faiblement d'un facteur de 0,04 et 0,2 respectivement dans les molécules d'OPG produites dans la souche *mdoD217::cml*.

L'augmentation du nombre de résidus de glucose liés en position 1 et 2 par rapport aux points de branchement engendre une molécule d'OPG moins branchée dans la souche *mdoD217::cml*.

Cette structure plus longue et moins branchée engendre la formation de nouvelles espèces de molécules d'OPG et explique la différence de profil sur la colonne d'échange d'anions entre les OPG provenant de la souche sauvage et ceux de la souche *mdoD217::cml*. Le gène *mdoD* modifierait la structure du squelette glucosidique des OPG et permettrait une homogénéisation des molécules lors de la biosynthèse du squelette glucosidique par le complexe MdoGH.

III) Complémentation de la mutation *mdoD*.

L'augmentation de l'hétérogénéité des OPG observée sur colonne d'échange d'anion a été mise à profit afin de déterminer la complémentation de la mutation du gène *mdoD*. Les OPG ont été radio-marqués à l'aide du (U-¹⁴C) glucose, extraits et purifiés sur colonne de filtration sur gel (biogel P4) puis analysés sur une colonne d'échange d'anions (DEAE Séphacel).

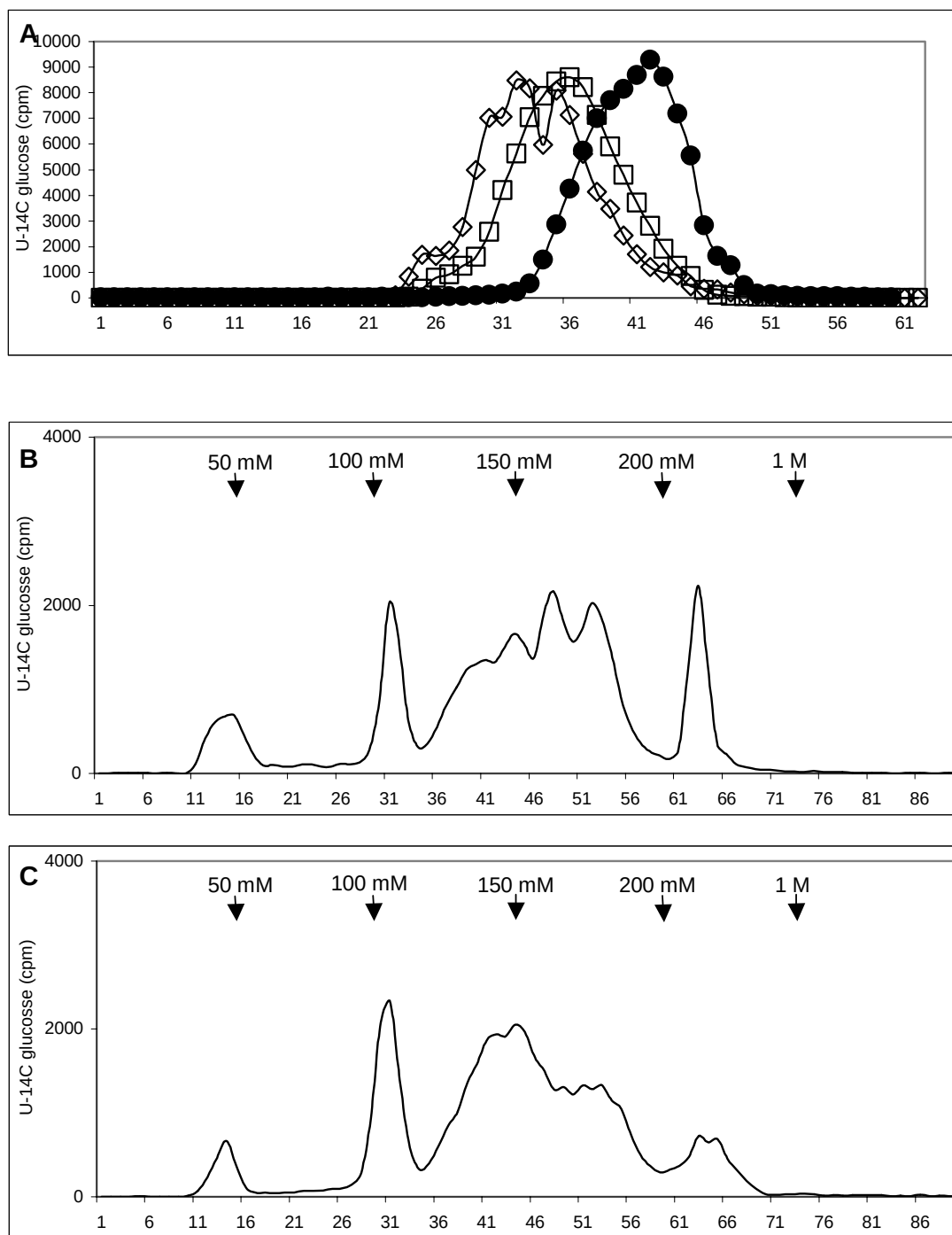


Figure 34 : Analyse des OPG des souches NFB1473 et NFB 1483. Les OPG des souches DF214 (cercle plein), NFB1483 (losange vide) et NFB1473 (carré vide) ont été séparés sur une colonne de filtration sur gel (A) et sur une colonne d'échange d'anions pour la souche NFB1483 (B) et NFB1473 (C). La radioactivité (cpm) du (U-14C) glucose est représentée sur les axes des ordonnées. Les fractions sont représentées sur les axes des abscisses.

1) Complémentation de la mutation *mdoD217::cml*.

a) Complémentation par les plasmides pNF573 et pNF565.

La souche NFB1925 a été transformée par le plasmide pNF573 portant le fragment *EcoRI-HindIII* du plasmide pNF570 dans la même orientation que le promoteur *placUV5* du vecteur pYZ4 et donnant la souche NFB1473, ou par le plasmide pNF565 portant le fragment *Sall-Sall* cloné directement du phage lambda 1A6 de la banque de Kohara [Kohara et coll., 1987] donnant la souche NFB1483 (figure 30). Les OPG extraits des souches NFB1473 et NFB1483 sont élués 7 fractions avant ceux extraits d'une souche sauvage sur colonne de filtration sur gel (figure 34A). Le profil d'élution sur la colonne d'échange d'anions révèle une hétérogénéité semblable à celle observée avec les OPG provenant de la souche *mdoD217::cml* (NFB1925). Pour les deux souches arborant le plasmide pNF565 ou pNF573, les proportions des pics I, II et V sont semblables à celles des OPG provenant de la souche sauvage (figure 34BC). Par contre les pics III et IV ne sont pas distinctement séparés et forment un pic d'allure complexe comme sur le profil des OPG extraits de la souche NFB1925.

Le fragment couvrant le gène *mdoD* bordé de 1000 pb en amont et de 4000 pb en aval (fragment *Sall-Sall*) n'est pas capable de compléter la mutation *mdoD217::cml*.

L'absence de complémentation par un fragment couvrant largement le gène *mdoD* de part et d'autre est très surprenante. Plusieurs hypothèses ont été émises : l'allèle contenu sur le fragment du phage 1A6 de la banque de Kohara est inactif [Kohara et coll., 1987], l'expression initiée à partir du promoteur du gène *mdoD* est inefficace sur le plasmide, l'allèle *mdoD217::cml* engendre une influence sur la biosynthèse des OPG.

L'ORF *b1423* située en amont à 225 paires de bases serait impliquée dans la biosynthèse des OPG ou organisée en opéron avec le gène *mdoD*.

b) Influence des allèles *mdoD*⁺ et *mdoD217::cml*.

La souche DF214 (*mdoD*⁺) a été transformée par le plasmide pNF565 (*mdoD*⁺, NFB1487) pour déterminer si la surexpression de la protéine MdoD engendrait un phénotype similaire au phénotype mutant ou par le plasmide pNF571 (*mdoD217::cml*, NFB1486) afin de déterminer si l'allèle *mdoD217::cml* était dominant sur l'allèle sauvage.

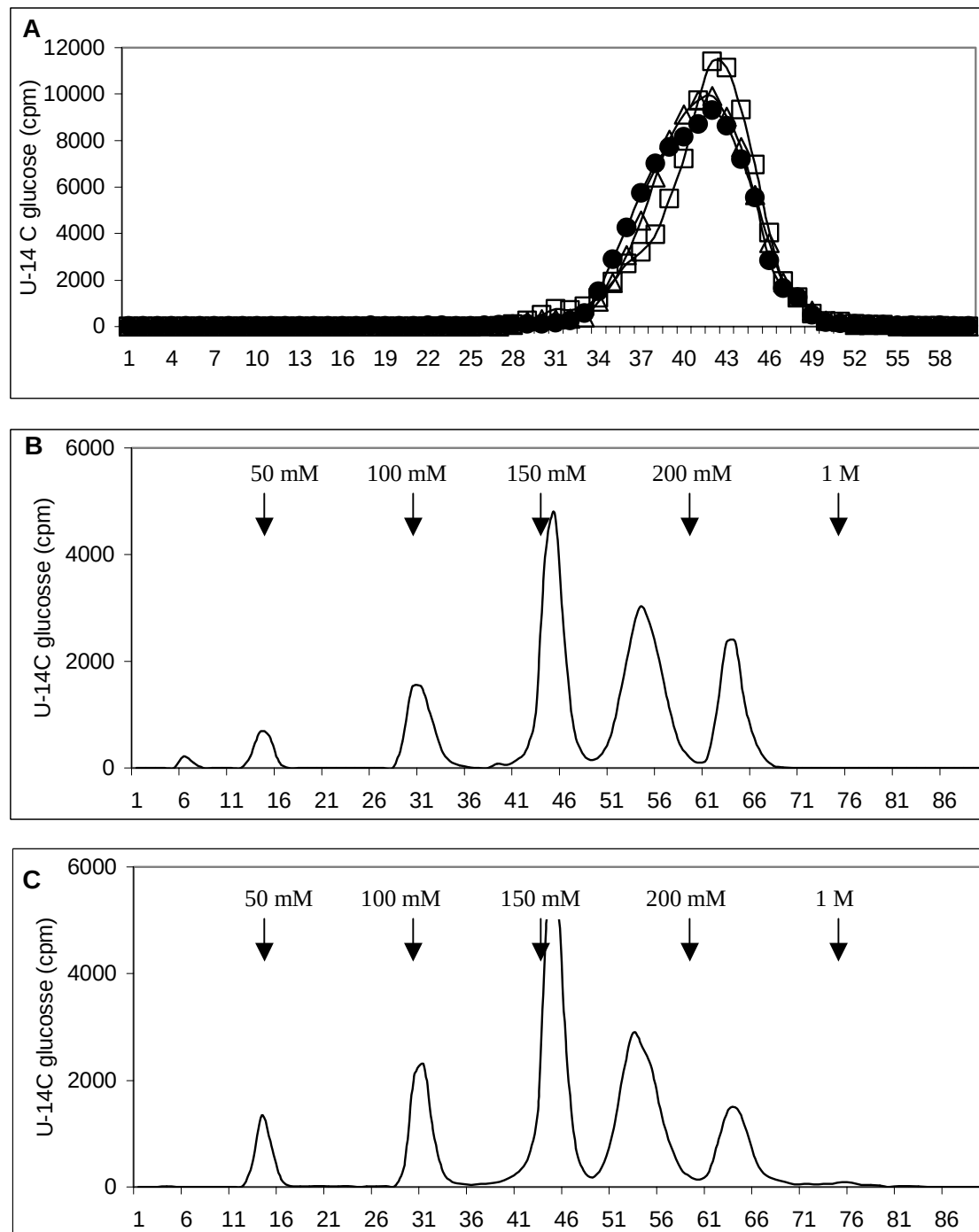


Figure 35 : Influences des allèles *mdoD*⁺ et *mdoD217::cml* en multicopies sur la biosynthèse de OPG dans une souche sauvage. Séparation des OPG sur une colonne de filtration sur gel (A) de la souche sauvage (cercle plein) de la souche NFB1486 (triangle vide) et de la souche NFB1487 (carré vide). Séparation des OPG sur colonne de d'échange d'anions de la souche NFB1486 (B) et de la souche NFB1487 (C).

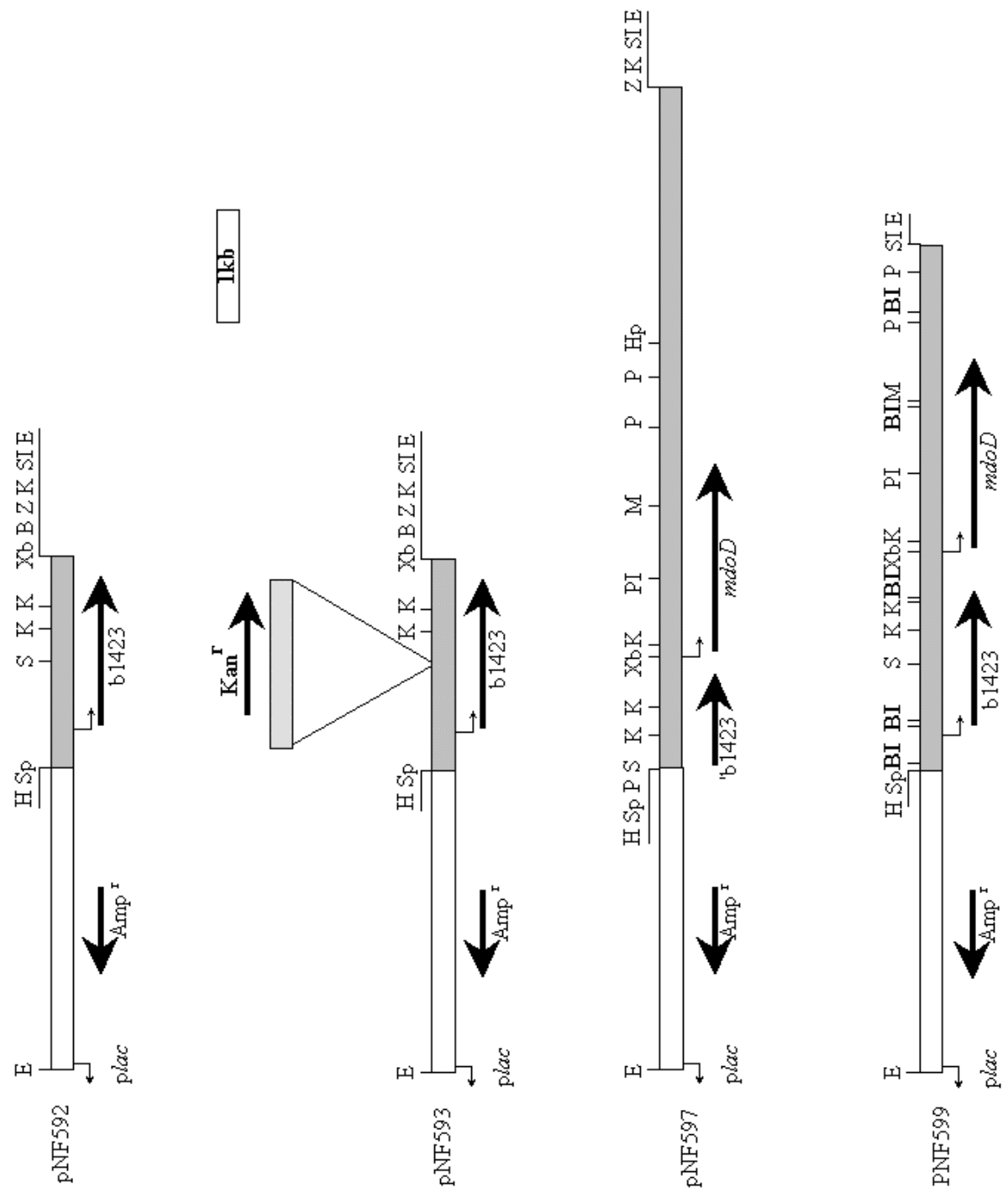


Figure 36 : Inactivation de l'ORF *b1423* et clonage de l'allèle *mdoD* chromosomique. Le plasmide pNF592 porte uniquement l'ORF *b1423*. Le plasmide pNF593 porte la cassette de résistance à la kanamycine insérée dans le site *SalI* de l'ORF *b1423*. Le plasmide pNF597 porte le gène *mdoD* d'origine chromosomique. Le plasmide pNF599 porte L'ORF *b1423* et le gène *mdoD*. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III, K, *Kpn*I; M, *Mlu*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I, Sp, *Sph*I; SI, *Sac*I; SII, *Sac*II; V, *Eco*RV; Xb, *Xba*I; Z, *Sma*I; PvI, *Pvu*I; Hp, *Hpa*I; N, *Nco*I; BI, *Bpm*I.

Les profils d'élution des OPG sur la colonne de filtration et d'échange d'anions sont semblables au profil obtenu avec les OPG provenant de la souche sauvage DF214 (figure 35). La mutation *mdoD217::cml* n'apparaît pas dominante et la surexpression de la protéine MdoD sauvage ne semble pas engendrer une augmentation de l'hétérogénéité des OPG.

c) Complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par un allèle *mdoD*⁺ d'origine chromosomique.

✎ Clonage de l'allèle *mdoD*⁺ chromosomique sauvage.

La stratégie a consisté à insérer une cassette de résistance à la kanamycine dans l'ORF *b1423* située à 225 pb en amont puis à cloner un fragment contenant la cassette de résistance à la kanamycine et le gène *mdoD* chromosomique. Pour cela, L'ADN du phage 1A6 a été digéré par les enzymes de restriction *Xba*I et *Sph*I et les extrémités ont été rendues franches. Le fragment a été cloné dans le site de restriction *Hinc*II du vecteur pUC18 donnant le vecteur pNF592. Un fragment *Sal*I-*Sal*I du plasmide pNF79 contenant la cassette de résistance à la kanamycine a été inséré dans le site *Sal*I du plasmide pNF592 donnant l'allèle *b1423::neo* porté par le plasmide pNF593 (figure 36). Ce plasmide a été linéarisé et utilisé pour transformer la souche JC7623. 7 clones résistants à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline ont été récupérés, mis en culture et utilisés pour générer un lysat de phage P1. Ce lysat a permis de transduire la mutation *b1423::neo* dans une souche DF214 donnant la souche NFB1987. Le fragment *Sma*I-*Sma*I de l'ADN chromosomique de la souche NFB1987 a été cloné dans le site *Sma*I du vecteur pUC18 donnant le plasmide pNF596. Ce plasmide a été délété par l'enzyme de restriction *Sal*I pour éliminer la cassette de résistance à la kanamycine donnant le plasmide pNF597 portant le gène *mdoD* sauvage provenant du chromosome de la souche DF214 et bordé de 1000 pb en amont et 3400 pb en aval. La souche NFB1925 a été transformée par le plasmide pNF597 donnant la souche NFB1564.

✎ Complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par l'allèle *mdoD*⁺ d'origine chromosomique.

Les OPG provenant de la souche NFB1564 ont été extraits et analysés sur une colonne de filtration sur gel et d'échange d'anions. Les OPG provenant de la souche NFB1564 sont élués 4 à 5 fractions avant ceux de la souche DF214 sur la colonne de filtration sur gel (figure 37A). Sur la colonne d'échange d'anions, les proportions des pics I (3%) et II (15%) du profil des OPG provenant de la souche NFB1564 sont sensiblement identiques aux pics I et II du profil des OPG provenant de la souche sauvage (figure 37C).

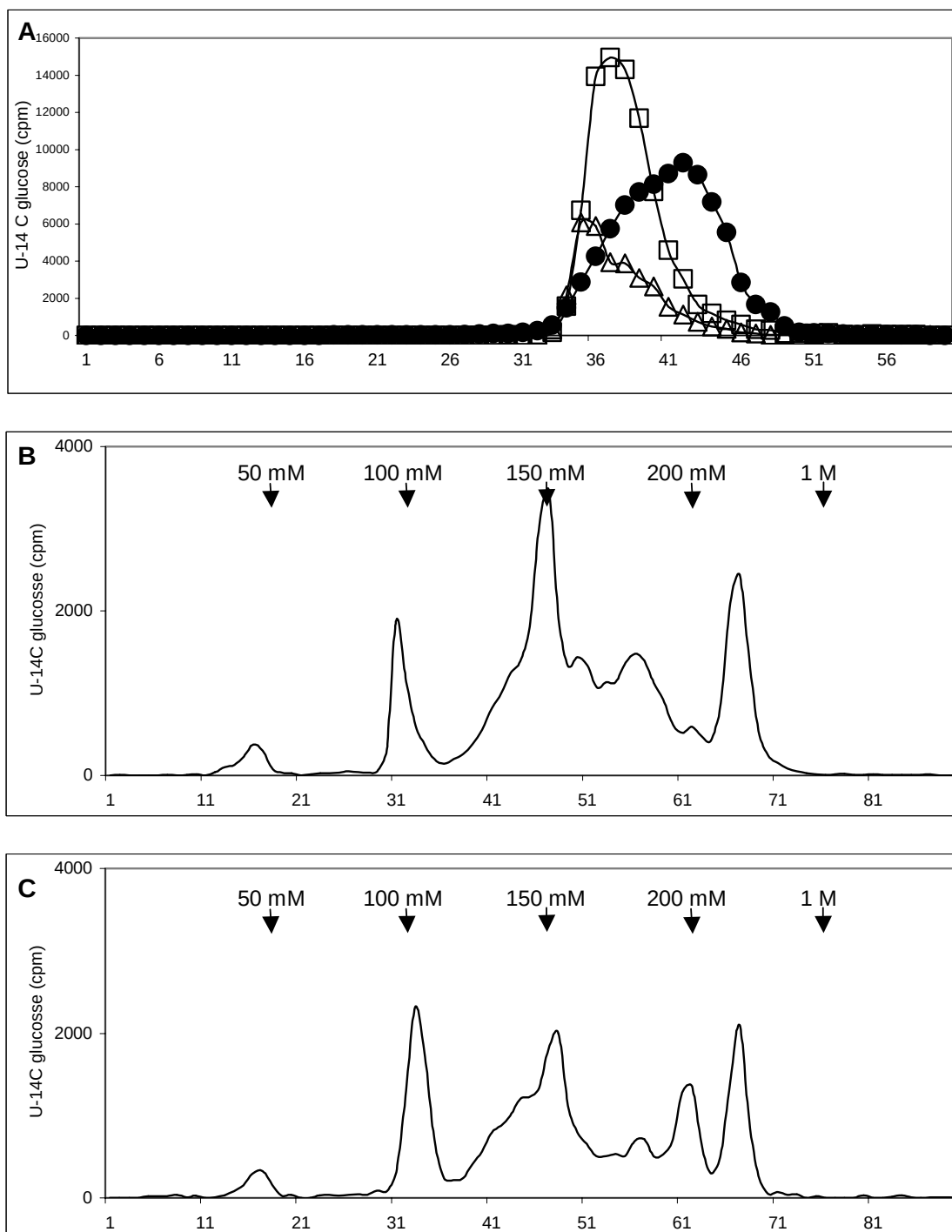


Figure 37 : Analyses des OPG de la souche NFB1564. Séparation des OPG sur une colonne de filtration sur gel (A) de la souche sauvage (cercle plein), de la souche NFB1564 à basse osmolarité (carré vide) et à haute osmolarité (triangle vide). Séparation sur une colonne d'échange d'anions de la souche NFB1564 à basse osmolarité (B) et à haute osmolarité (C). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité due au (U-14C) glucose. Les fractions sont représentées sur les axes des abscisses.

Les pics III et IV identifiés sur le profil des OPG extraits de la souche sauvage ne sont pas distinctement séparés et forment un pic d'allure complexe de proportion et d'allure semblable au pic complexe observé sur le profil des OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*.

Ces résultats montrent une augmentation de l'hétérogénéité des OPG provenant de la souche NFB1564 par rapport à la souche sauvage. Par conséquent, le fragment *SalI-SmaI* portant le gène *mdoD* provenant du chromosome de la souche sauvage DF214 bordé de 1000 pb en amont et 3400 pb en aval est insuffisant pour compléter la mutation *mdoD217::cml*.

↪ Effet de l'osmolarité sur la complémentation.

Les OPG provenant de la souche NFB1564 ont été extraits à partir de cellules cultivées dans un milieu de haute osmolarité (milieu LOS à 670 mosM) ; puisque que les fusions *mdoD-lacZ* (voir paragraphe C) ont révélé une augmentation précoce et plus importante à haute osmolarité.

Les OPG ont été purifiés sur une colonne de filtration sur gel et séparés sur une colonne d'échange d'anions. Les résultats ont révélé une diminution du taux de biosynthèse des OPG de 2,4 fois due à la répression de la biosynthèse des OPG par l'augmentation de l'osmolarité (figure 37A). La taille relative et le caractère anionique des OPG issus de cellules NFB1564 cultivées à haute osmolarité sont semblables à ceux d'une souche *mdoD217::cml* (figure 37C). La culture des bactéries à haute osmolarité ne permet pas la complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par le plasmide pNF597.

2) Influence de l'ORF *b1423* sur la biosynthèse des OPG.

a) Influence de l'allèle *b1423::neo* sur la biosynthèse des OPG.

Sur une colonne de filtration sur gel, les OPG produits par la souche NFB1987 ont été élués 8 à 9 fractions avant ceux d'une souche sauvage (DF214) (figure 38A). Sur une colonne d'échange d'anions, la proportion du pic I (2,5%) reste semblable et celle du pic II (12%) diminue sensiblement par rapport à la souche sauvage (15%) (figure 38B). La proportion du pic V augmente d'un facteur 1,8 par rapport au profil des OPG provenant de la souche sauvage. Les pics III et IV identifiés sur le profil des OPG extraits de la souche sauvage ne sont pas distinctement séparés et forment un pic d'allure complexe comme sur le profil des OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*.

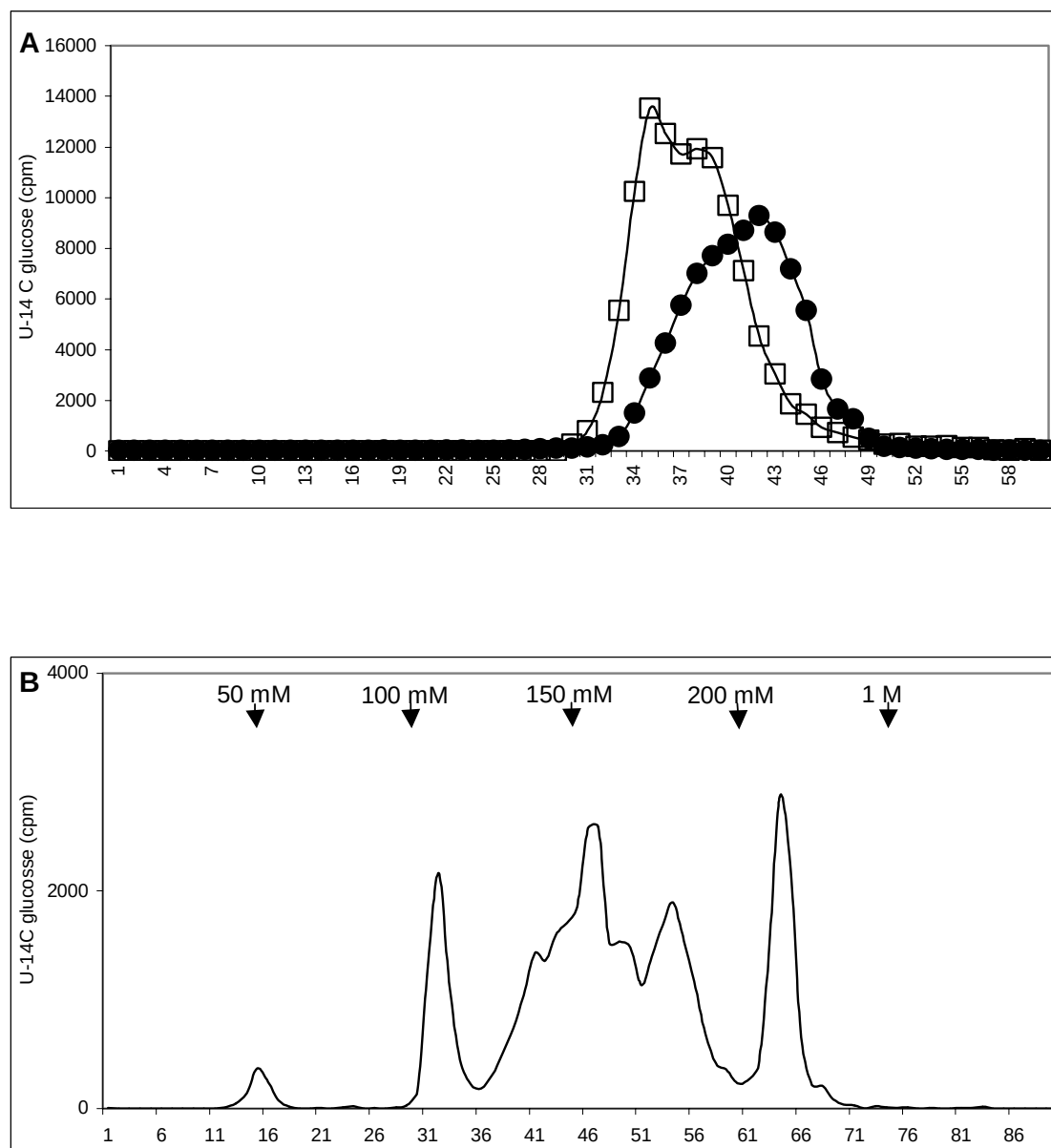


Figure 38 : Influence de la mutation *b1423::neo* sur la synthèse des OPG. Séparation des OPG sur une colonne de filtration sur gel (A) de la souche sauvage DF214 (cercle plein) et de la souche *b1423::neo* (carré vide). Séparation des OPG sur une colonne d'échange d'anions de la souche *b1423::neo* (B). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U-¹⁴C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

La proportion de ce pic complexe (67,5%) est sensiblement plus faible que la somme des pics III (40%) et IV (35%) du profil des OPG issus de la souche sauvage. Les OPG provenant de la souche NFB1987 montrent donc une augmentation de l'hétérogénéité lors de leur séparation sur colonne d'échange d'anions par rapport à la souche sauvage.

L'inactivation de l'ORF *b1423* dont le codon stop est situé 225 paires de bases en amont du gène *mdoD* engendre une augmentation de l'hétérogénéité des OPG identique à celle trouvée sur le profil des OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*. Trois hypothèses peuvent expliquer ce phénotype. Le produit de l'ORF *b1423* est impliqué directement dans la biosynthèse des OPG, l'ORF *b1423* et le gène *mdoD* sont organisés en opéron ou une séquence régulatrice du gène *mdoD* est située très en amont dans l'ORF *b1423*.

b) Complémentation de la mutation *b1423::neo*.

Le plasmide pNF592 contenant l'ORF *b1423* sur le fragment *SphI-XbaI* et le plasmide pNF599 contenant l'ORF *b1423* et le gène *mdoD* sur le fragment *SphI-SmaI* ont été utilisés pour vérifier si la protéine codée par l'ORF *b1423* était impliquée directement dans la biosynthèse des OPG ou si la transcription du gène *mdoD* était dépendante d'éléments de régulation situés en amont. La souche NFB1987 a donc été transformée par les deux plasmides pNF592 et pNF599 (figure 36), donnant respectivement les souches NFB1521 et NFB1524.

Sur une colonne de filtration sur gel, les OPG provenant de la souche NFB1521 sont élués 6 à 7 fractions avant ceux de la souche DF214 (figure 39A). Les OPG de la souche NFB1521 ont ensuite été analysés sur une colonne d'échange d'anions (figure 39B). Le pic I, le pic II et le pic V du profil des OPG issus de la souche NFB1521 restent semblables par rapport au pic I et II et V du profil des OPG issus de la souche sauvage. Par contre, les pics III et IV identifiés sur le profil des OPG provenant de la souche sauvage ne sont pas distinctement séparés et forment un pic d'allure complexe sur le profil des OPG provenant de la souche NFB1521. La proportion de ce pic complexe (70%) est sensiblement inférieure à la somme des proportions des pics III et IV du profil des OPG issus de la souche sauvage.

Cette augmentation de l'hétérogénéité des OPG au niveau des pics III et IV est caractéristique des OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*. Le plasmide portant uniquement l'ORF *b1423* ne permet pas de rétablir un phénotype sauvage. Par conséquent, la protéine B1423 n'intervient pas directement dans la biosynthèse des OPG.

Les OPG provenant de la souche NFB1524 (NFB1987 contenant le plasmide pNF599) ont été ensuite analysés comme ci-dessus.

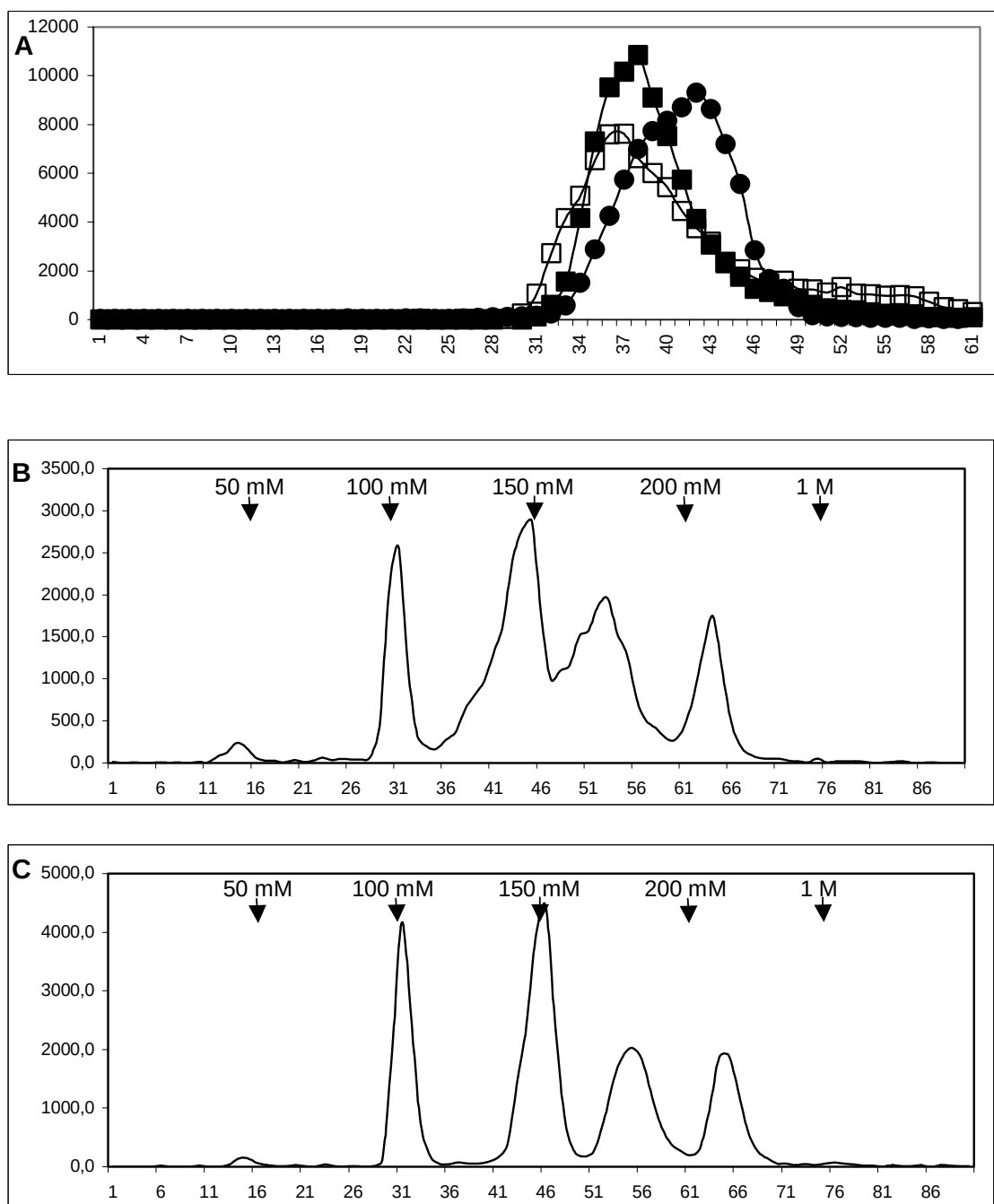


Figure 39 : Complémentation de la mutation *b1423::neo*. Séparation des OPG sur colonne de filtration sur gel (A) de la souche sauvage DF214 (cercle plein), de la souche NF1521 (carré vide) et de la souche NF1524 (carré plein). Séparation des OPG sur une colonne d'échange d'anions de la souche NF1521 (B) et de la souche NF1524 (C). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U- 14 C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

Ses OPG ont été élués 2 à 3 fractions avant ceux de la souche DF214 sur la colonne de filtration sur gel (figure 39A). Sur le profil de la colonne d'échange d'anions, la proportion du pic I (1%) des OPG provenant de la souche NFB1524 reste identique à celle du pic I du profil des OPG provenant de la souche sauvage (figure 39C). Les proportions des pics II (22%) et V (16%) du profil des OPG provenant de la souche NFB1524 montrent une augmentation par rapport aux pics II (15%) et V (10%) du profil des OPG extraits de la souche sauvage.

Les pics III et IV du profil des OPG extraits de la souche NFB1524 se superposent exactement aux pics III et IV du profil des OPG extraits de la souche sauvage. Néanmoins les proportions des pics III (36%) et IV (25%) du profil des OPG extraits de la souche NFB1521 diminuent légèrement par rapport aux pics III (40%) et IV (35%) du profil des OPG extraits de la souche sauvage.

Le fragment *SphI-SmaI*, portant l'ORF *b1423* et le gène *mdoD*, permet de rétablir une hétérogénéité des OPG semblable à celle retrouvée dans les OPG provenant d'une souche sauvage. Ce fragment est donc capable de compléter la mutation *b1423::neo* située en amont du gène *mdoD*. Ces résultats montrent un effet en *cis* de la mutation *b1423::neo* sur l'expression du gène *mdoD*.

3) Complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par le plasmide pNF599.

La souche NFB1925 a été transformée par le plasmide pNF599 (figure 36) donnant la souche NFB1523. Les OPG ont été radio-marqués, purifiés sur colonne de filtration sur gel et séparés sur colonne d'échange d'anions.

Les OPG sont élués 3 à 4 fractions avant ceux de la souche sauvage sur la colonne de filtration sur gel (figure 40A). Sur une colonne d'échange d'anions, la proportion du pic I (3%) s'est révélée semblable à celle du pic I sur le profil des OPG extraits de la souche sauvage. La proportion du pic II (10%) diminue d'un facteur 1,5 par rapport à celle du pic II (15%) du profil des OPG extraits de la souche sauvage (figure 40B). Les pics III et IV identifiés sur le profil des OPG provenant de la souche sauvage ne sont pas distinctement séparés et forment un pic d'allure complexe comme avec les OPG provenant de la souche NFB1925. Le pic V (16%) obtenu avec les OPG provenant de la souche NFB1523 voit sa proportion augmentée d'un facteur 1,6 par rapport à la souche sauvage. Le profil des OPG provenant de la souche NFB1523 sur la colonne d'échange d'anions révèle donc une augmentation de l'hétérogénéité par rapport au profil des OPG provenant de la souche sauvage.

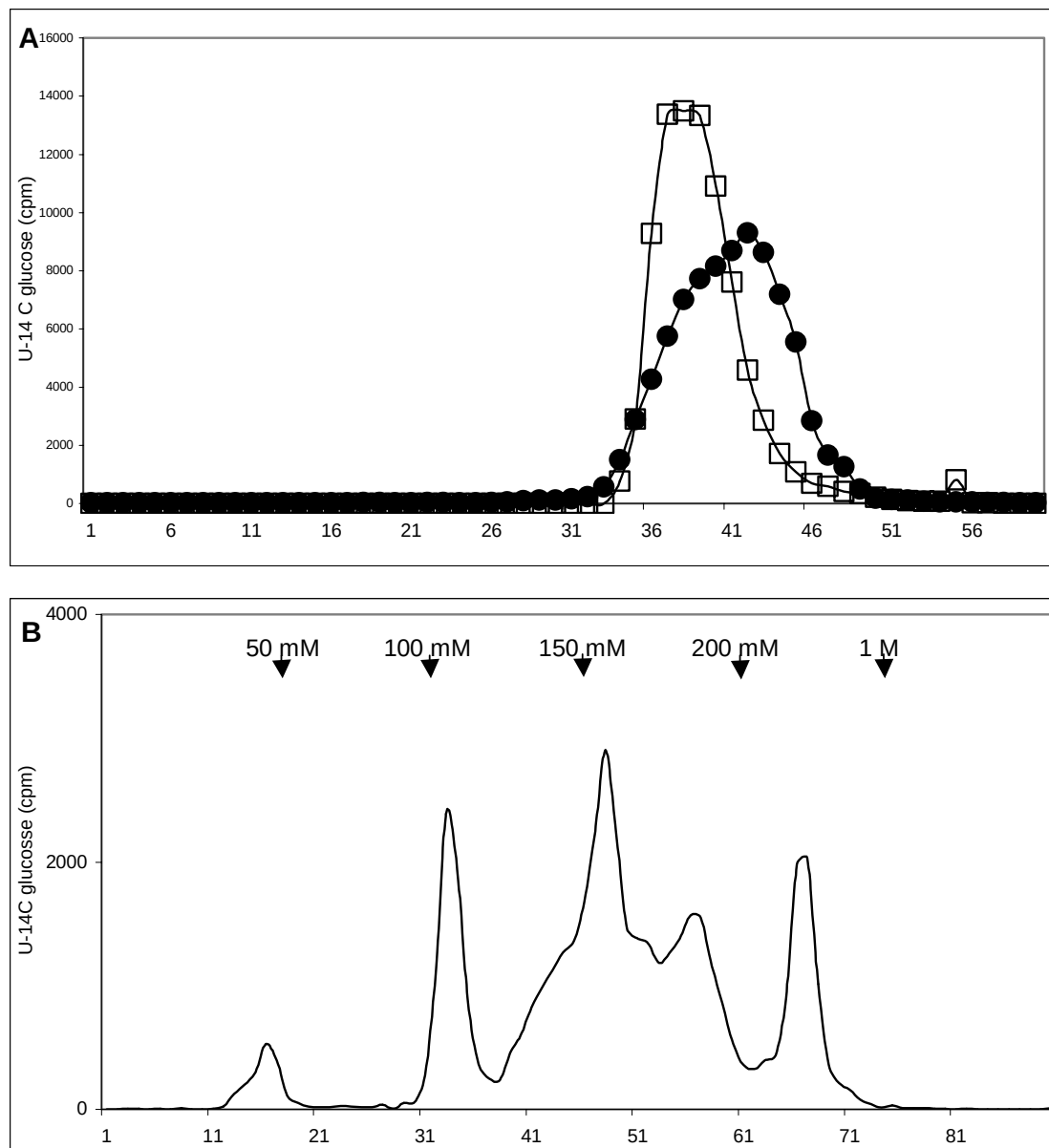
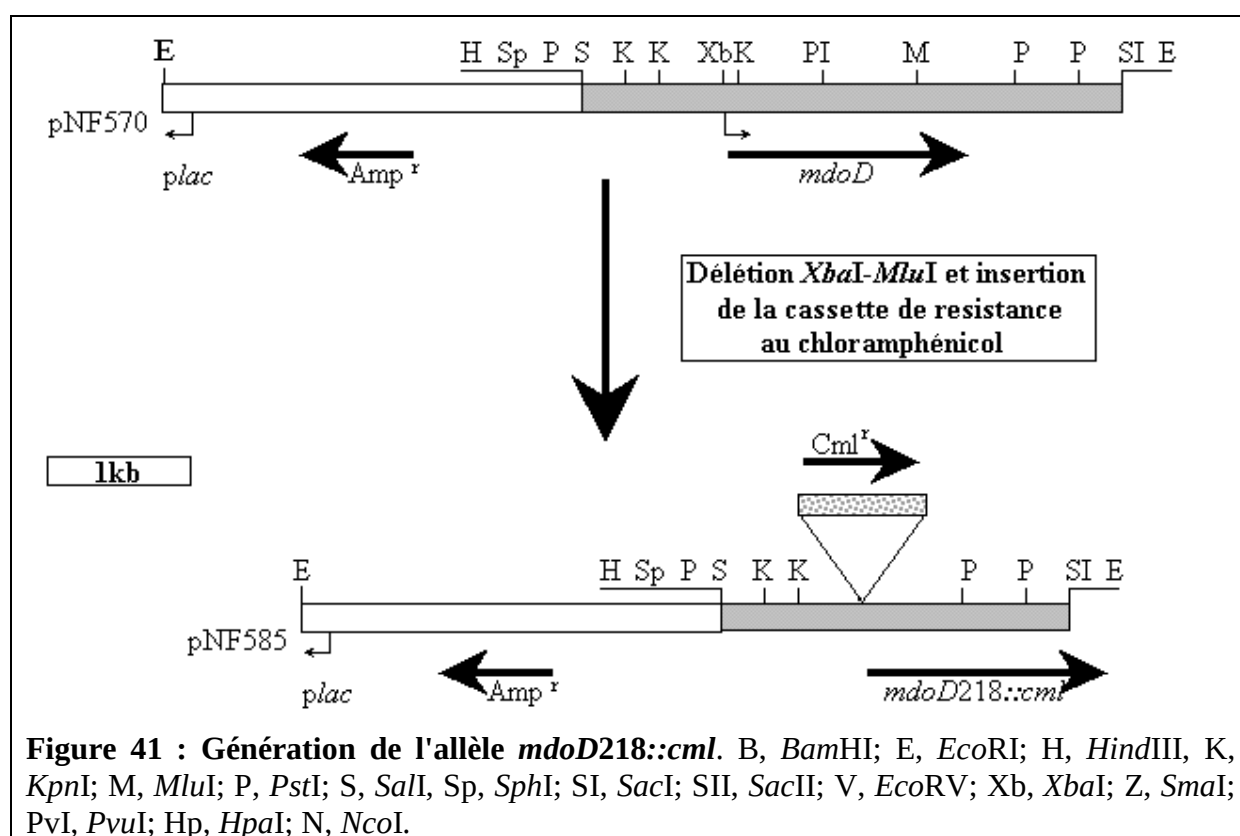


Figure 40 : Complémentation de l'allèle *mdoD217::cml* par le plasmide pNF599. Séparation des OPG sur une colonne de filtration sur gel (A) de la souche sauvage DF214 (cercle plein) et de la souche NFB1523 (carré vide). Séparation des OPG sur une colonne d'échange d'anions de la souche NFB1523 (B). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U-¹⁴C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

L'influence en *cis* de la mutation *b1423::neo* et l'absence de complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par le gène *mdoD* sauvage d'origine chromosomique suggère que les plasmides ne contenant pas 2000 pb en amont du gène *mdoD* soient incapables d'exprimer le gène *mdoD*. Cette absence de complémentation observée avec les plasmides pNF573 et pNF565 est donc due à l'absence d'expression du gène *mdoD* et non pas une mutation dans l'allèle *mdoD* de la banque de Kohara. L'absence de complémentation de la mutation *mdoD217::cml* par le plasmide pNF599 qui permet l'expression de *mdoD* (complémente la mutation *b1423::neo* d'effet *cis*) suggère une dominance de l'allèle *mdoD217::cml* sur l'allèle *mdoD* sauvage. L'absence d'influence de l'allèle *mdoD217::cml* plasmidique à partir du plasmide NF565 (voir III,1,b) sur la biosynthèse des OPG dans une souche sauvage peut donc s'expliquer par l'absence d'expression de cet allèle *mdoD217::cml* dans le plasmide utilisé qui ne contenait pas 2000 pb en amont de gène *mdoD*.



4) Complémentation de l'allèle *mdoD218::cml*.

Un nouvel allèle *mdoD* inactif a donc été généré par l'insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol à la place des premiers tiers du gène *mdoD*.

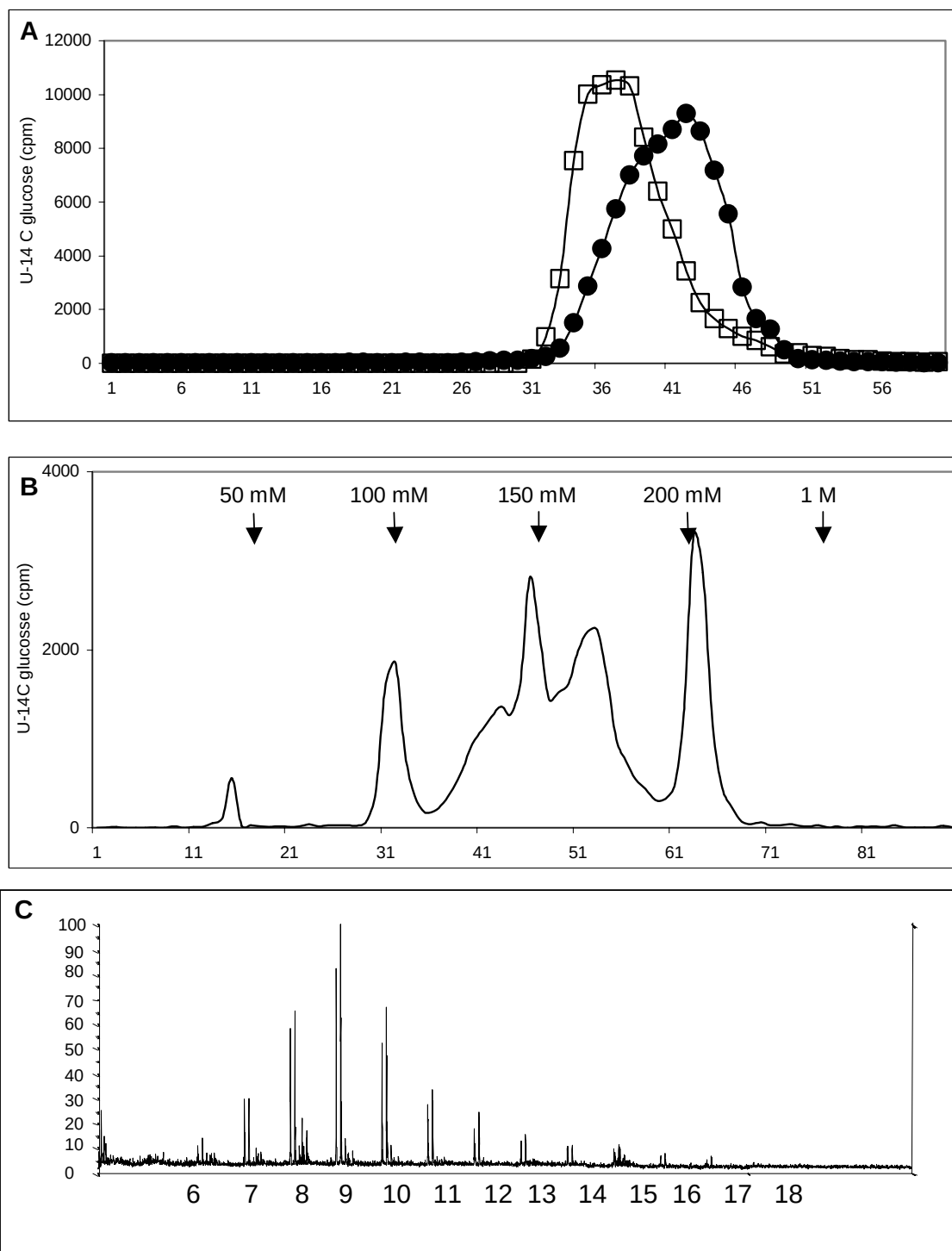


Figure 42 : Influences de la mutation *mdoD218::cml* sur la biosynthèse des OPG. Séparation des OPG extraits de la souche sauvage (cercle plein) et de la souche *mdoD218::cml* (carré vide) sur une colonne de filtration sur gel (A). Séparation des OPG extraits de la souche *mdoD218::cml* sur une colonne d'échange d'anions (B). Spectre de masse des squelettes glucosidiques des OPG extraits de la souche *mdoD218::cml* (C). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U-¹⁴C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

La cassette de résistance au chloramphénicol, portée par un fragment *Fui* aux extrémités bouchées, a été insérée dans le plasmide pNF572 (*mdoD*⁺) digéré par les enzymes de restriction *Xba*I et *Mlu*I dont les extrémités ont été bouchées à l'aide de l'ADN-polymérase I (fragment de Klenow). Cet allèle a été nommé *mdoD218::cml* (figure 41).

Le plasmide résultant (pNF585) a été linéarisé par l'enzyme *Eco*RI et utilisé pour transformer la souche JC7623 qui permet un échange d'allèle aisé entre le chromosome et le plasmide. Les clones recombinants ont été sélectionnés sur un milieu contenant du chloramphénicol. 10 clones résistants au chloramphénicol et sensibles à l'ampicilline ont été récupérés, mis en culture et utilisés pour générer un lysat de phage P1. Ce lysat de phage P1 a permis de transduire la mutation *mdoD218::cml* dans une souche DF214 donnant la souche NFB1967.

a) Influence de l'allèle *mdoD218::cml* sur la biosynthèse des OPG.

L'influence de la mutation *mdoD218::cml* sur la biosynthèse des OPG a été analysée sur une colonne de filtration sur gel, d'échange d'anions, en spectrométrie de masse et par l'analyse des produits d'OPG partiellement méthylés et acétylés par une chromatographie en phase gazeuse.

Un décalage de 6 à 7 fractions des OPG produits par la souche NFB1967 a été révélé sur une colonne de filtration sur gel, semblable à celui observé pour les OPG produit par une souche *mdoD217::cml* (NFB1925) (figure 42A). Sur colonne d'échange d'anions, le profil des OPG produits par la souche *mdoD218::cml* a révélé une augmentation de l'hétérogénéité des OPG par rapport à la souche sauvage. Les proportions des pics I (2%) et II (12%) sont restées sensiblement identiques. Par contre, les pics III et IV identifiés sur le profil des OPG extraits de la souche sauvage ne sont pas distinctement séparés et forme un pic d'allure complexe (figure 42B).

La proportion de ce pic complexe (66%) est légèrement inférieure à celles des pics III et IV du profil des OPG provenant de la souche sauvage. Ce profil traduit une augmentation de l'hétérogénéité des OPG dans une souche *mdoD218::cml* comparable à celle observée sur le profil des OPG extraits d'une souche *mdoD217::cml*.

Cette augmentation de l'hétérogénéité des OPG issus de la souche NFB1967 a été confirmée par la détermination de la taille du squelette glucosidique désubstitué. Le spectre de masse a révélé 13 types de molécules formées de 6 à 18 résidus de glucoses (figure 42C). La mutation *mdoD218::cml* engendre une augmentation de la taille des OPG similaire à celle observe avec la mutation *mdoD217::cml*.

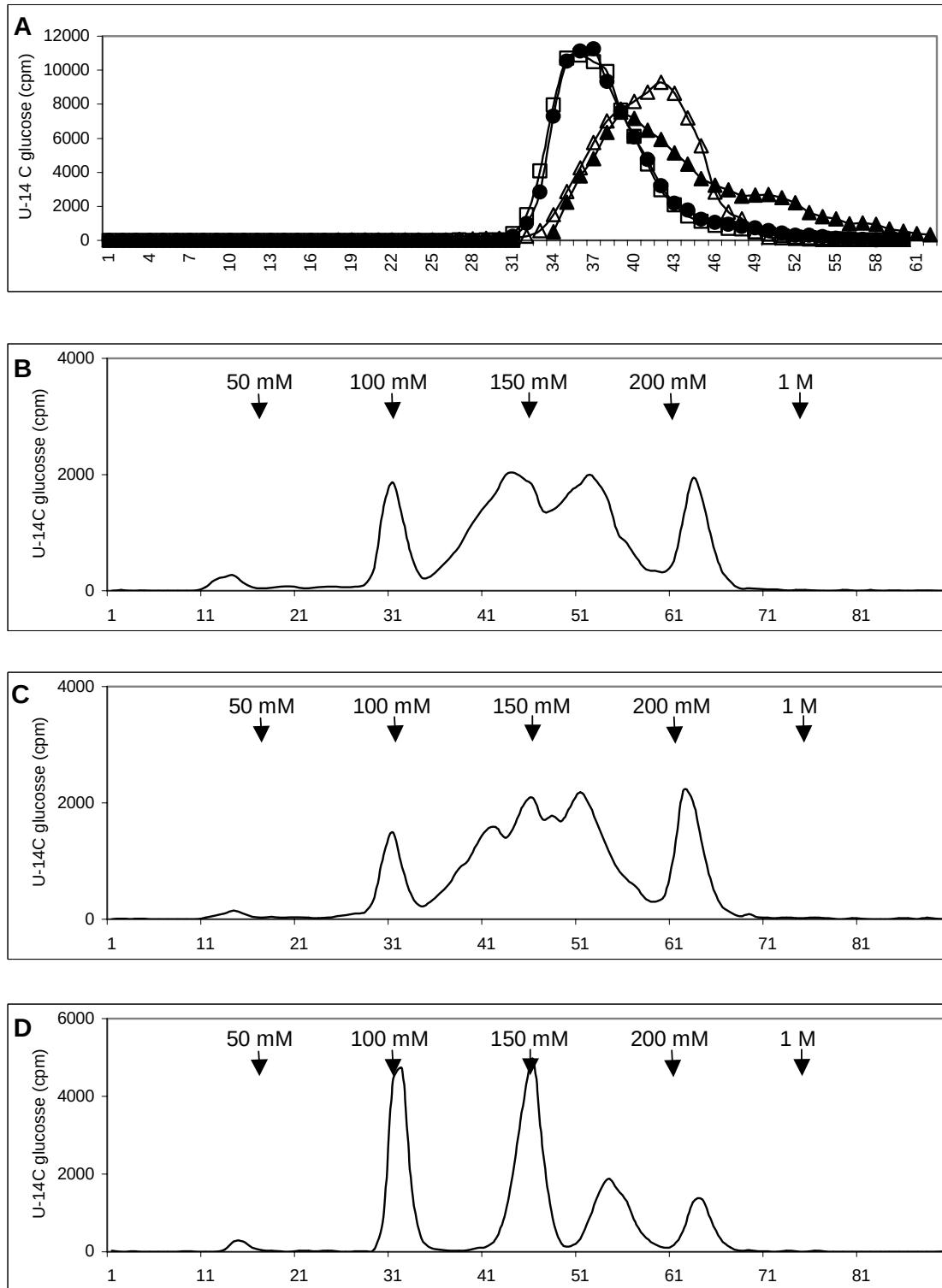


Figure 43 : Complémentation de la mutation *mdoD218::cml*. Séparation des OPG extraits des souches sauvage DF214 (cercle plein), NF1565 (triangle vide), NF1566 (carré vide) et NFB1567 (triangle plein) sur une colonne de filtration sur gel (A). Séparation sur une colonne d'échange d'anions des OPG extraits des souches NF1565 (B), de la souche NF1566 (C) et de la souche NF1567 (D). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U-¹⁴C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses.

Les espèces majeures d'OPG contiennent 9 à 10 résidus de glucose par molécules. L'analyse des dérivés partiellement méthylés et acétylés des OPG en chromatographie en phase gaz a révélé une représentation 2 fois plus importante du nombre de résidus de glucose liés en β -1,2 par rapport au nombre de points de branchement (résidus de glucose liés en β -1,2,6) alors que les proportions de ces deux espèces sont équivalentes dans les OPG extraits d'une souche sauvage.

La mutation *mdoD218::cml* cause une augmentation de l'hétérogénéité des OPG semblable à celle engendrée par la mutation *mdoD217::cml*.

b) Complémentation de l'allèle *mdoD218::cml*.

La souche NFB1967 a été transformée par les plasmides pNF587 (contenant le gène *mdoD* sous contrôle de *plac*), pNF597 (contenant le gène *mdoD* d'origine chromosomique) ou pNF599 donnant respectivement les souches NFB1565, NFB1566 et NFB1567.

Sur la colonne de filtration sur gel, le pic des OPG provenant de la souche NFB1567 apparaît étalé vers les molécules de petite taille et élué avec un décalage de 2 à 3 fractions par rapport aux OPG provenant de la souche DF214 (figure 43A).

Sur la colonne d'échange d'anions, la proportion du pic II sur le profil des OPG provenant de la souche NFB1567 augmente de 1,8 fois par rapport au pic II du profil des OPG issus de la souche sauvage (figure 43D). La proportion du pic IV diminue de 1,6 fois par rapport au pic IV du profil des OPG issus de la souche sauvage. Par contre, Les cinq pics du profil des OPG provenant de la souche NFB1567 sont distinctement élués et se superposent exactement à ceux du profil des OPG provenant de la souche sauvage.

Des tests de complémentation avec les souches NFB1565 et NFB1566 (figure 43BC) contenant des plasmides plus petits (figure 36) ont été réalisés. Le plasmide pNF597 ne permet pas de diminuer l'hétérogénéité des OPG sur colonne d'échange d'anions. Par contre, l'hétérogénéité du profil des OPG extraits de la souche NFB1565 semble être intermédiaire entre celle des OPG provenant d'une souche sauvage et mutante (*mdoD*).

Le plasmide contenant un fragment couvrant l'ORF *b1423* et le gène *mdoD* semble donc capable de diminuer l'hétérogénéité des OPG synthétisés par la souche *mdoD218::cml* mais pas celle des OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*. La mutation *mdoD217::cml* semble avoir un effet dominant. L'expression du gène *mdoD* dépendrait de séquences en *cis* très en amont situées à plus de 1093 pb du gène *mdoD*. Cette dépendance pourrait être le fait de la présence de séquences régulatrices situées très en amont, d'une conformation spécifique de l'ADN absente dans des plasmides de petite taille ou de l'organisation en opéron de l'ORF

b1423 et du gène *mdoD*.

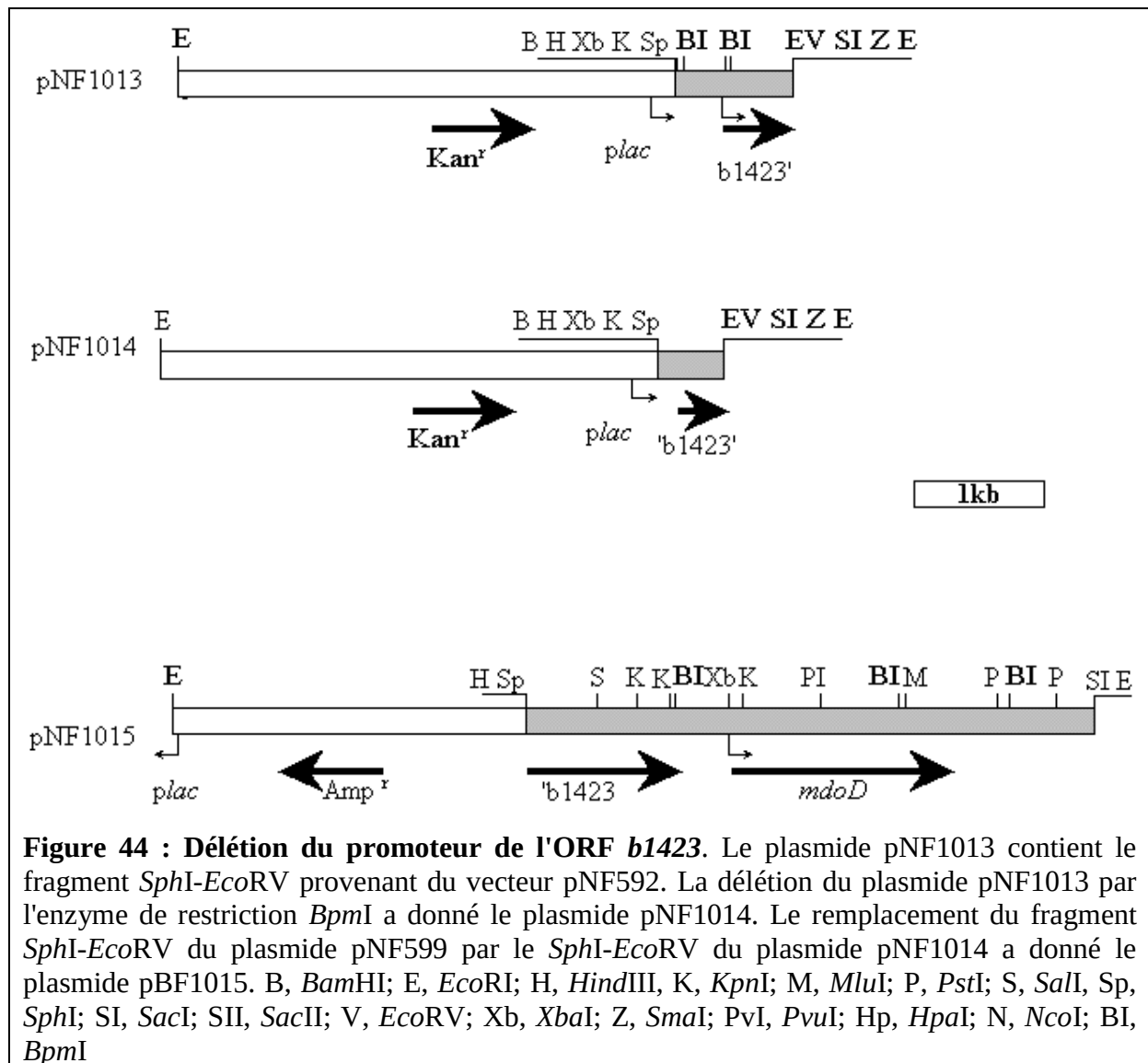


Figure 44 : Délétion du promoteur de l'ORF *b1423*. Le plasmide pNF1013 contient le fragment *SphI-EcoRV* provenant du vecteur pNF592. La délétion du plasmide pNF1013 par l'enzyme de restriction *BpmI* a donné le plasmide pNF1014. Le remplacement du fragment *SphI-EcoRV* du plasmide pNF599 par le *SphI-EcoRV* du plasmide pNF1014 a donné le plasmide pBF1015. B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluI*; P, *PstI*; S, *Sall*; Sp, *SphI*; SI, *SacI*; SII, *SacII*; V, *EcoRV*; Xb, *XbaI*; Z, *SmaI*; PvI, *PvuI*; Hp, *HpaI*; N, *NcoI*; BI, *BpmI*

5) L'expression du gène *mdoD* dépend-elle du promoteur de l'ORF *b1423* ?

a) Délétion du promoteur putatif de l'ORF *b1423*.

L'ORF *b1423* comprise entre les coordonnées 1493312 et 1494655 code potentiellement une protéine de 447 acides aminés. Le fragment *SphI-EcoRV* provenant du plasmide pNF592 cloné dans le vecteur pYZ4 (pNF1013) a été délété d'un fragment *BpmI* de 387 pb contenant le promoteur putatif de l'ORF *b1423* (pNF1014) et dont les sites de restriction sont situés aux coordonnées suivantes : 1492931-1493318.

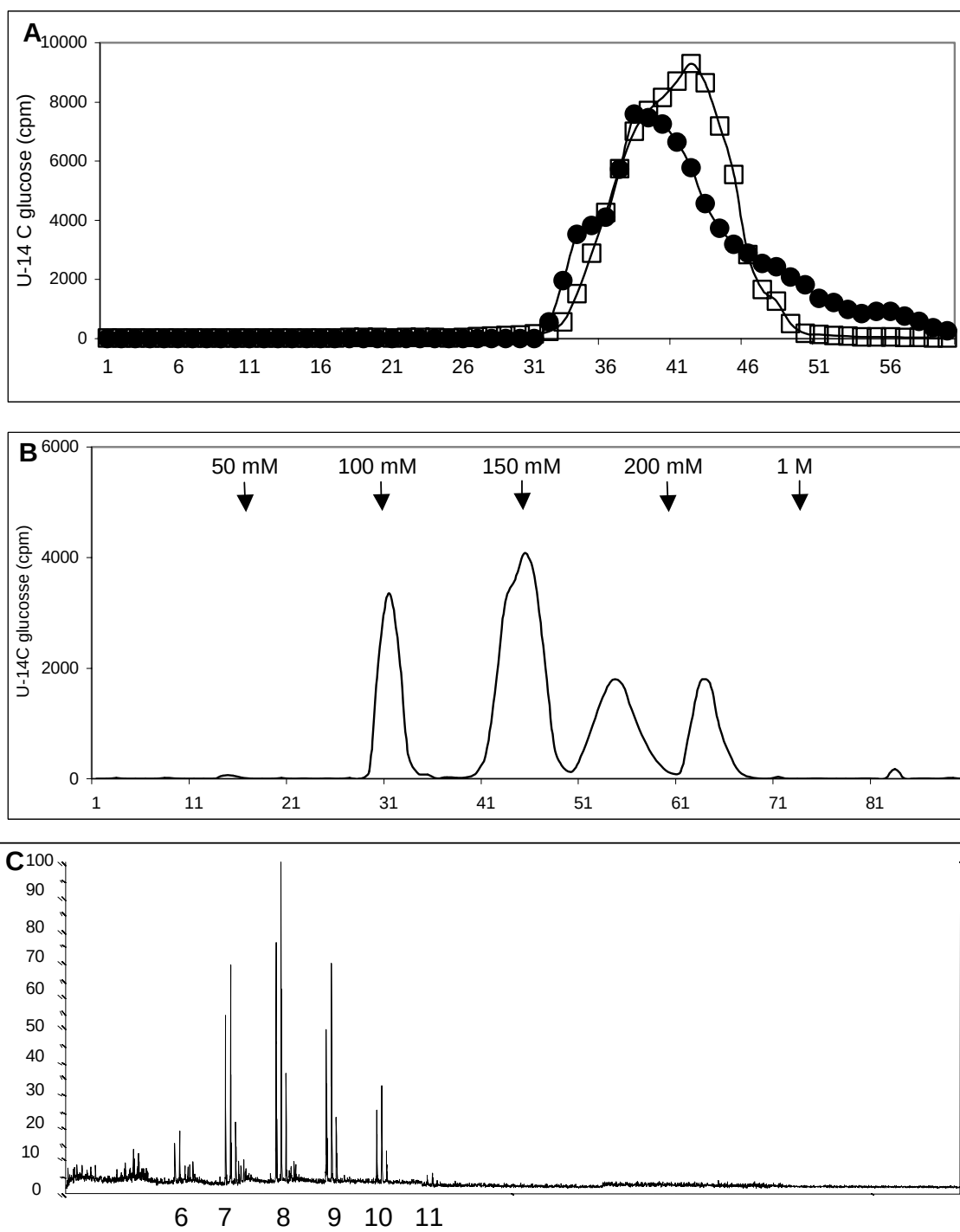


Figure 45 : Complémentation de la mutation *mdoD218::cml* par le plasmide pNF1015. (A) Purification des OPG extraits des souches NFB1554 et DF214. (B) Séparation des OPG extraits de la souche NFB1554. Les axes des ordonnées représentent la radioactivité en cpm du (U-¹⁴C)glucose. Les fractions sont numérotées sur les axes des abscisses. (C) Spectre de masse des OPG extraits de la souche NFB1554. La taille des molécules est représentée sur les axes des abscisses. L'axe des ordonnées est gradué en pourcentage d'intensité.

Ce fragment *SphI-EcoRV* délété du fragment *BpmI* (pNF1014) a été cloné en place du fragment *SphI-EcoRV* du plasmide pNF599 donnant le plasmide pNF1015 (figure 44). La souche NFB1967 a été transformée par le plasmide pNF1015 (NFB1554) et les OPG radiomarqués par le (U-¹⁴C) glucose ont été extraits.

b) Complémentation de la mutation *mdoD218::cml*.

Les OPG séparés sur une colonne de filtration sur gel sont élués 2 à 3 fractions devant les OPG provenant de la souche sauvage mais 4 à 5 fractions après ceux de la souche NFB1967 (figure 45A). Les OPG ont ensuite été analysés sur une colonne d'échange d'anions. La proportion du pic I (1,4%) reste inchangée. Les pics III et IV sont distinctement séparés et se superposent à ceux du profil des OPG provenant de la souche sauvage. Ceci implique une diminution de l'hétérogénéité du caractère anionique de ces OPG par rapport à une souche *mdoD218::cml*. De faibles variations de l'ordre de 3 à 4% dans les proportions des pics II, III et V sont observées par rapport au profil des OPG provenant de la souche sauvage (figure 45B). Par contre, la proportion du pic IV (21,3%) des OPG provenant de la souche NFB1554 diminue de 1,6 fois par rapport à celle (35%) des OPG provenant de la souche sauvage.

L'analyse par spectrométrie de masse de la taille des squelettes glucosidiques désubstitués des OPG provenant de la souche NFB1554 révèle 8 types de molécules contenant de 6 à 13 résidus de glucose par molécules comme ceux issus de la souche sauvage. L'espèce majoritaire est représentée par une molécule de 8 résidus de glucose.

Le taux de branchement du squelette glucosidique des OPG extraits de la souche NFB1554 est identique à celui des OPG extraits de la souche sauvage.

Le plasmide pNF1015 permet de compléter la mutation *mdoD218::cml*. L'expression gène *mdoD* ne dépend donc pas du promoteur de l'ORF *b1423*. Une séquence régulatrice située en amont du site *SalI* (1093 pb en amont du gène *mdoD*) ou la conformation de l'ADN semble être indispensable à l'expression correcte du gène *mdoD*.

C) Etude de la régulation du gène *MDOD*.

I) Génération de fusions traductionnelles *mdoD-lacZ*.

Les tests de complémentation de la mutation *mdoD218::cml* indiquent l'importance d'une région amont située au-delà du site de restriction *SalI* pour l'expression du gène *mdoD*.

D'autre part, la protéine *mdoD* a été visualisée en phase stationnaire sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle (figure 29) [Link et coll., 1997a]. Deux fusions traductionnelles ont donc été générées pour étudier la régulation du gène *mdoD*. La première fusion *mdoD-lacZ* possède 519 pb en amont du codon initiateur du gène *mdoD*. Cette fusion *mdoD-lacZ* sera par la suite appelée la petite fusion *mdoD-lacZ*.

La seconde fusion *mdoD-lacZ* possède un fragment de 1626 pb en amont du codon initiateur du gène *mdoD* jouant un rôle crucial dans la complémentation de la mutation *mdoD218::cml*. Cette fusion *mdoD-lacZ* sera par la suite appelée la grande fusion *mdoD-lacZ*.

1) Clonage de la petite fusion *mdoD-lacZ* traductionnelle.

Les extrémités de la bande *KpnI-KpnI* de 0,575 kb (coordonnées génomiques : 1494358-1494932) provenant de la digestion du plasmide pNF570 ont été rendues franches par l'action de l'enzyme de l'ADN polymérase I du fragment de Klenow. Ce fragment contenant le promoteur putatif du gène *mdoD* a été inséré dans le plasmide pNM482 au niveau du site *SmaI* et rabouté (figure 46) donnant le plasmide pNF574. La souche XL1-blue a été transformée par ce mélange de ligation et les clones bleus ont été récupérés.

La vérification de l'insertion de la bande désirée a été réalisée par une digestion avec l'enzyme de restriction *SspI* dont un site se trouve dans la bande de 0,5 kb et deux dans le vecteur de clonage pNM482.

Cette petite fusion *mdoD-lacZ* contient donc les 519 nucléotides précédents le codon initiateur potentiel et les 52 premiers nucléotides du gène *mdoD*. Le plasmide pNF574 a été utilisé pour effectuer les mesures d'activité β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* en multi-copies dans différentes conditions.

2) Clonage de la grande fusion *mdoD-lacZ* traductionnelle.

Le fragment *SphI-XbaI* du plasmide pNF1015 a été rendu bout franc sur son extrémité *SphI* grâce l'activité exonucléase de l'ADN polymérase I du fragment de Klenow.

Le plasmide pNF574 portant la petite fusion *mdoD-lacZ* a été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* dont l'extrémité a été rendue franche grâce à l'activité polymérase de l'ADN polymérase I du fragment de Klenow. Ce plasmide linéarisé a été digéré par l'enzyme de restriction *XbaI*.

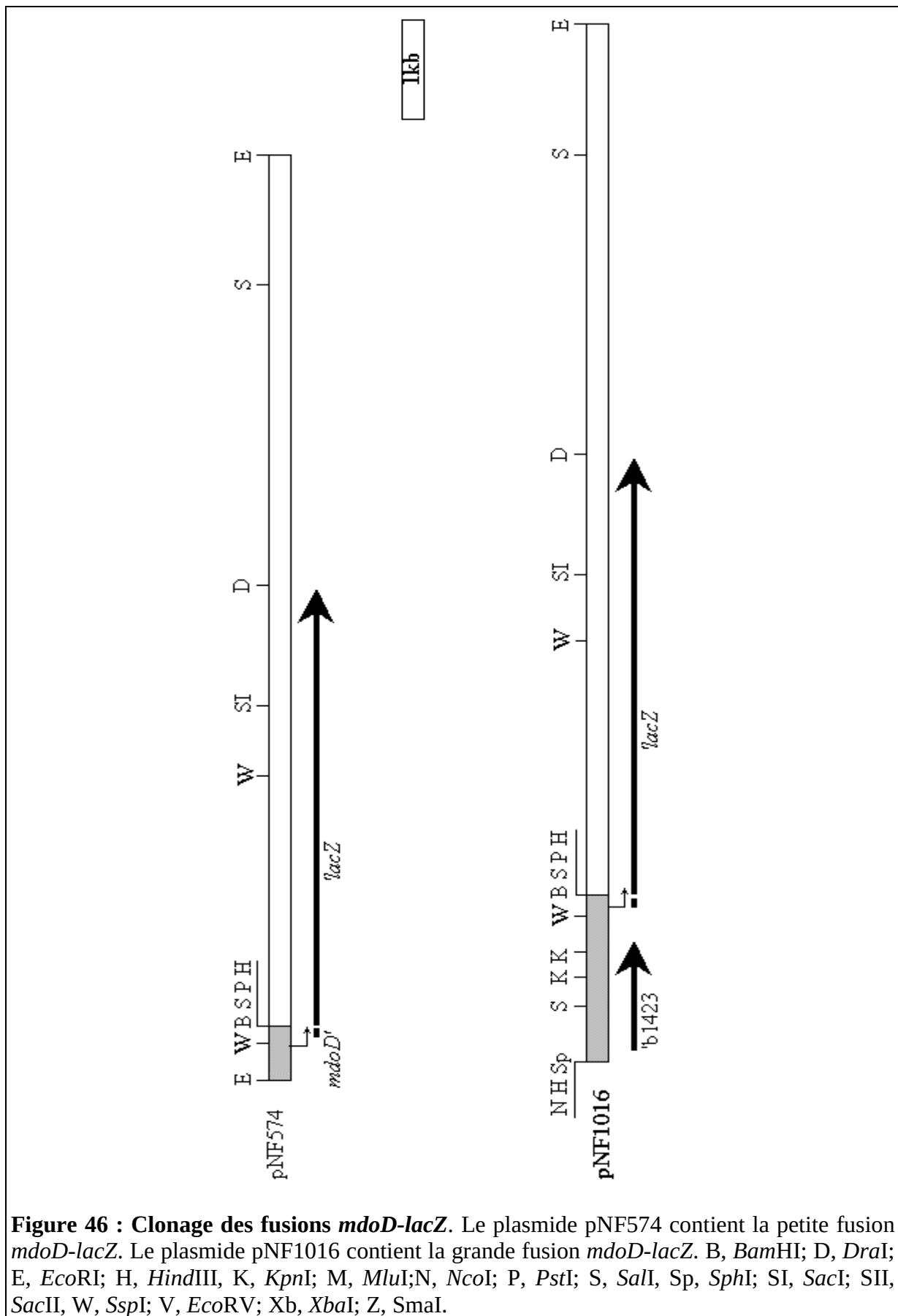


Figure 46 : Clonage des fusions *mdoD-lacZ*. Le plasmide pNF574 contient la petite fusion *mdoD-lacZ*. Le plasmide pNF1016 contient la grande fusion *mdoD-lacZ*. B, *Bam*HI; D, *Dra*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; M, *Mlu*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I, Sp, *Sph*I; SI, *Sac*I; SII, *Sac*II, W, *Ssp*I; V, *Eco*RV; Xb, *Xba*I; Z, *Sma*I.

Le fragment *SphI-XbaI* traité ci-dessus et provenant du plasmide pNF1015 a été inséré en place du fragment *EcoRI-XbaI* du plasmide pNF574 traité comme ci-dessus pour donner le plasmide pNF1016 qui porte la grande fusion *mdoD-lacZ* (figure 46).

Cette fusion *mdoD-lacZ* possède 1626 pb en amont du codon initiateur du gène *mdoD* et les 52 premiers nucléotides du gène *mdoD*. Le promoteur de l'ORF *b1423* est absent de ce fragment.

3) Insertions des fusions *mdoD-lacZ* sur le chromosome d'*E. coli*.

Les extrémités du fragment *EcoRI-DraI* du plasmide pNF574 ont été rendues franches et le fragment a été cloné dans le site *SmaI* du vecteur pUC18*NotI* donnant le plasmide pNF591 qui porte la petite fusion *mdoD-lacZ*. Par ailleurs, le fragment *XbaI-DraI* du plasmide pNF574 et le fragment *SphI-XbaI* du plasmide pNF1015 ont été clonés dans les sites *SphI* et *SmaI* du vecteur pUC18*NotI* pour donner le plasmide pNF1019 portant la grande fusion *mdoD-lacZ*. Les fusions se trouvent donc flanquées de deux sites *NotI*. Les fragments *NotI* des plasmides pNF591 et pNF1019 ont ensuite été clonés dans le site *NotI* du vecteur pUTminiTn5-kan [De lorenzo et coll., 1994] pour donner respectivement les plasmides pNF1012 et pNF1020. La souche CC118 λ pir a été transformée pour isoler les plasmides pNF1012 (NFB1513) et pNF1020 (NFB1563). Les fusions *mdoD-lacZ* se trouvent entre deux séquences IS50 provenant du transposon Tn5. Elles sont susceptibles être emportées lors d'un événement de transposition.

Les plasmides pNF1012 et pNF1020 ont ensuite été introduits dans la souche SM10 λ pir qui contient les fonctions nécessaires à la mobilisation des plasmides contenant l'origine *oriT*-RP4. Trois conjugaisons indépendantes entre la souche SM10 λ pir contenant le plasmide pNF1012 ou le plasmide pNF1020 avec la souche NFB362 non permissive ont été réalisées. Les événements de transposition de l'élément transposable contenant l'une des fusions ont été sélectionnés sur des boîtes LB contenant de la kanamycine et du X-gal.

Les clones bleus ont été récupérés et testés pour leur sensibilité à l'ampicilline attestant de la perte du plasmide.

Trois clones résistants à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline, provenant pour chacun d'eux d'une des trois conjugaisons indépendantes, ont été utilisés pour mesurer l'activité spécifique β -galactosidase des fusions *mdoD-lacZ*, en mono-copie, dans différentes conditions.

II) Expression du gène *mdoD* au cours de la courbe de croissance.

La protéine MdoD a été visualisée à partir d'extraits périsplasmiques issus d'une culture en phase stationnaire [Link et coll., 1997a] (figure 29). De plus, le gène possède des structures promotrices putatives spécifiques de gènes dépendants du facteur σ^S (figure 27). Nous avons donc décidé d'étudier l'activité de la β -galactosidase des fusions *mdoD-lacZ* (exprimées dans les unités Miller [Miller, 1992]) et l'activité de biosynthèse des OPG au cours du cycle cellulaire. L'activité de la β -galactosidase des fusions a été mesurée à partir de cellules cultivées en milieu complexe et perméabilisées suivant la méthode de Miller [Miller, 1992]

1) Activité spécifique de la grande fusion *mdoD-lacZ*.

L'activité de la β -galactosidase a été mesurée toutes les 1H30 à partir des clones contenant les fusions chromosomiques. Les valeurs représentent la moyenne des activités spécifiques de la β -galactosidase relevées pour les trois clones (figure 47A). Une activité spécifique basale de 2,4 U est détectée en début de phase exponentielle (DO_{620nm} 0,3). L'augmentation de l'activité de la β -galactosidase (7 U à DO_{620nm} 2) débute lors de la transition vers la phase stationnaire avec une augmentation d'un facteur 3. Un pic d'activité (14 U) est observé alors que les bactéries sont totalement entrées en phase stationnaire. Cette amplification équivaut à un facteur 6. Puis l'activité diminue pour atteindre 12 U soit une augmentation de 5 fois.

Les mêmes expériences ont été effectuées à partir de cellules contenant la grande fusion *mdoD-lacZ* sur un plasmide multi-copies (NFB1556). L'allure de la courbe de l'activité spécifique β -galactosidase est identique (figure 47B). Le décalage de 1H30 du pic d'activité de la β -galactosidase en phase stationnaire (facteur d'augmentation de 10) pourrait s'expliquer par une entrée plus rapide des bactéries en phase stationnaire. Ces relevés de l'activité spécifique de la β -galactosidase au cours de la phase de croissance montrent une augmentation de l'expression du gène *mdoD* préférentiellement lors de la transition vers la phase stationnaire qui se prolonge lors de la phase stationnaire avec la présence d'un pic d'activité fort en phase stationnaire précoce.

2) Activité spécifique de la petite fusion *mdoD-lacZ*.

L'analyse a tout d'abord été réalisée avec les trois fusions chromosomiques indépendantes.

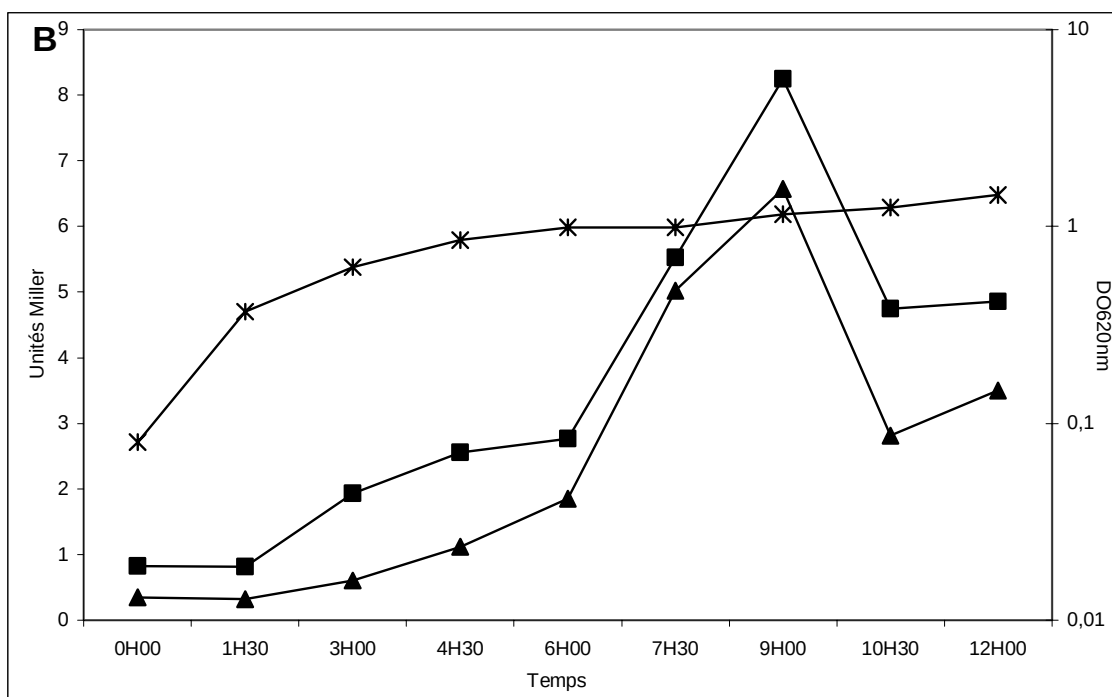
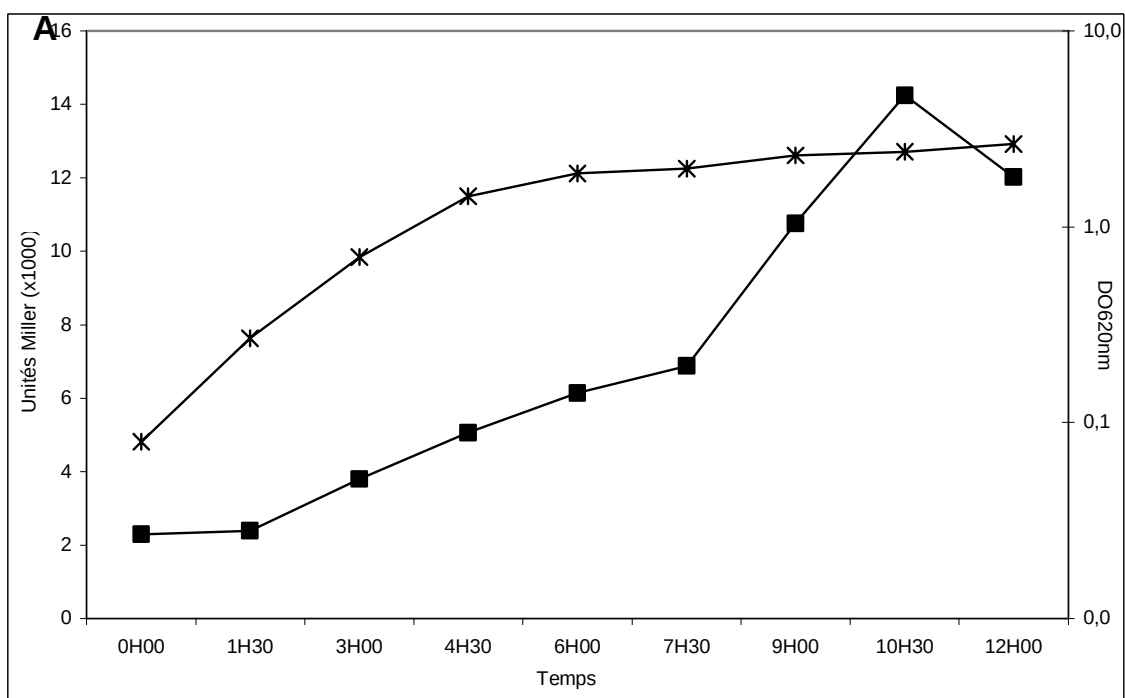


Figure 47 : Dosage de l'activité β -galactosidase de la grande fusion *mdoD-lacZ* au cours de la phase de croissance. La fusion est portée par le chromosome (triangle plein) de la souche sauvage (A). Les souches sauvage (carré plein) et *rpoS* NFB1802 (triangle plein) portent la grande fusion sur un plasmide (B). La croissance est suivie à DO_{620nm} (croix) (axe des ordonnées de droite). Les unités Miller sont notées sur les axes des ordonnées de gauche.

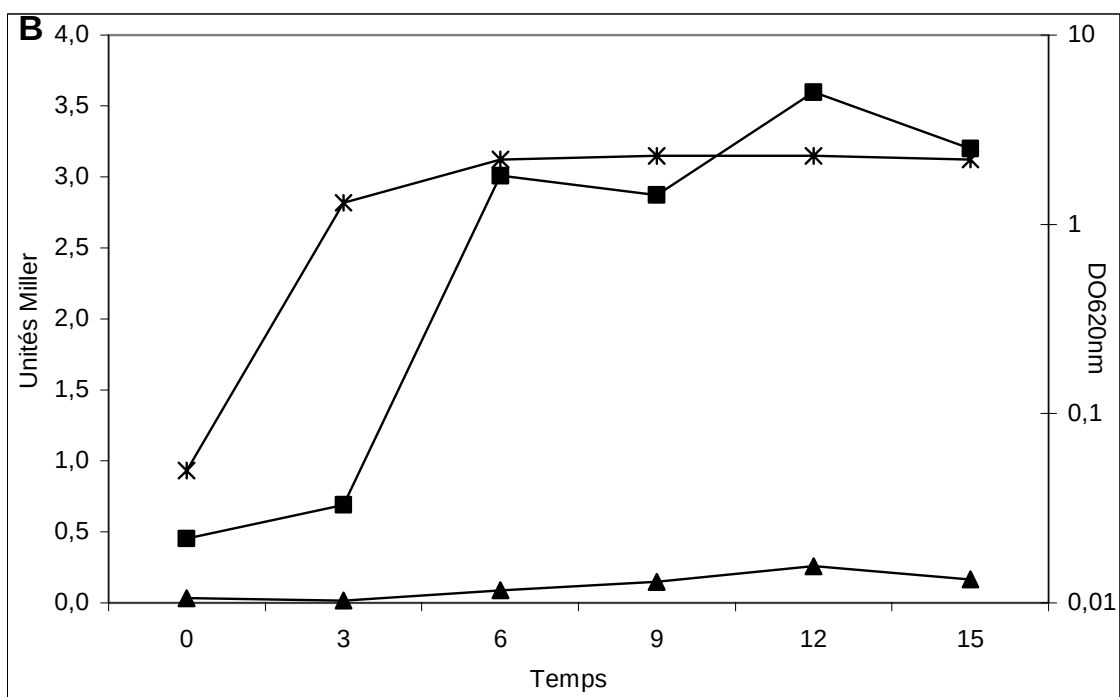
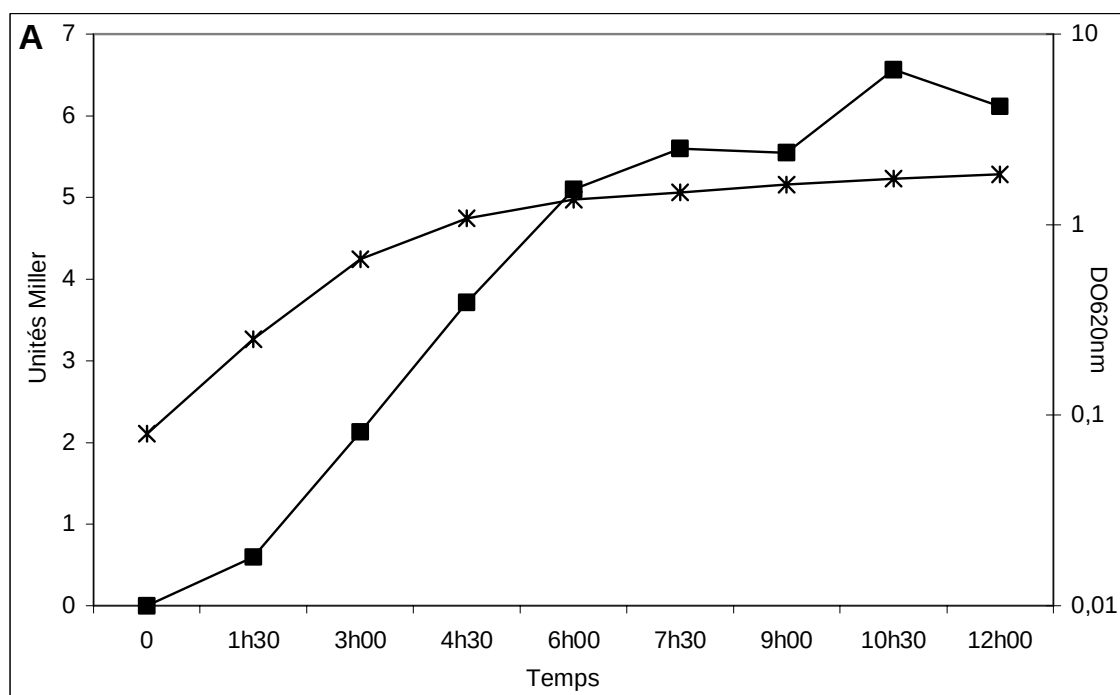


Figure 48: Dosage de l'activité β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* au cours de la phase de croissance. La fusion est portée sur le chromosome de la souche sauvage (A). Les souches sauvage (carré plein) et *rpoS* (triangle plein) portent la petite fusion *mdoD-lacZ* sur un plasmide (B). Les unités Miller sont notées sur l'axe des ordonnées de gauche. La croissance est suivie à DO620nm (croix) (l'axe des ordonnées de droite).

Les mesures ont été effectuées toutes les 1H30 (figure 48A) et les valeurs correspondent à la moyenne des activités spécifiques de la β -galactosidase relevées dans les trois clones. Une activité spécifique résiduelle de 0,6 U est détectée durant la phase exponentielle.

Par contre, l'activité spécifique de la β -galactosidase est induite lors de la transition vers la phase stationnaire (DO 0,7) et se stabilise à 6 U en moyenne lors de la phase stationnaire (DO_{620nm} 1,7), soit une augmentation d'un facteur dix par rapport à la phase exponentielle. Les mêmes résultats sont observés avec la souche NFB1470 qui porte la petite fusion *mdoD-lacZ* sur un plasmide multi-copies (figure 48B). Un facteur d'augmentation de huit a été mesuré entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

La petite fusion *mdoD-lacZ* semble donc être activée dès la transition vers la phase stationnaire, puis l'activité spécifique se maintient tout au long de la phase stationnaire.

Les deux fusions paraissent se comporter de la même manière au cours de la courbe de croissance, mais l'activité spécifique β -galactosidase est globalement plus importante avec la grande fusion *mdoD-lacZ*. Le niveau basal de l'activité spécifique β -galactosidase est 4,5 fois plus important en phase exponentielle et 2 fois plus important en phase stationnaire avec la grande fusion *mdoD-lacZ* par rapport à la petite fusion *mdoD-lacZ*. De plus, un pic d'activité est observé avec la grande fusion *mdoD-lacZ* alors que l'augmentation de la petite fusion *mdoD-lacZ* apparaît plus régulière au cours de la courbe de croissance.

Ces résultats suggèrent la présence d'une région régulatrice comprise entre les nucléotides 1093 et 1626 pb située en amont du codon initiateur du gène *mdoD* et nécessaire à son l'expression.

3) Activité spécifique des fusions dans un contexte *rpoS*.

Le facteur σ^S , codé par le gène *rpoS*, est spécifiquement induit pour initier la transcription d'un nombre important de gènes exprimés en phase stationnaire ou lors de stress. La protéine MdoD a été visualisée à partir d'extraits périsplasmiqes issus de cellules en phase stationnaire [Link et coll., 1997a].

L'activité spécifique de la β -galactosidase des deux fusions *mdoD-lacZ* a donc été mesurée dans une souche *rpoS* contenant le plasmide pNF1016 (NFB1557) ou le plasmide pNF574 (souche NFB1471). Les mesures d'activité de la β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* montrent une activité spécifique nulle tout au long de la courbe de croissance

(figure 48B).

Par contre avec la grande fusion *mdoD-lacZ*, l'activité spécifique de la β -galactosidase est induite au même moment que dans un contexte sauvage mais de manière atténuée (figure 47 B).

Une diminution de 50% lors de la transition vers la phase stationnaire et de 20% au niveau du pic d'activité enregistrée en phase stationnaire précoce sont mesurées par rapport à l'activité spécifique mesurée dans un contexte *rpoS*⁺. L'implication du facteur σ^S dans l'expression du gène *mdoD* apparaît plus importante lors de la transition vers la phase stationnaire qu'en phase stationnaire établie pour la grande fusion. Ces résultats suggèrent que la transcription du gène *mdoD* dépende de l'ARN-polymérase associée au facteur σ^S ($E\sigma^S$) et au facteur σ^{70} ($E\sigma^{70}$). Lors de la phase exponentielle, l'activité basale serait uniquement dépendante du facteur σ^{70} . La transcription du gène *mdoD* dépendrait de $E\sigma^{70}$ et de $E\sigma^S$ de manière équivalente lors de la transition vers la phase stationnaire et en majorité du facteur $E\sigma^{70}$ lors de la phase stationnaire. Une séquence régulatrice, située entre 1093 et 1626 pb en amont du gène *mdoD*, pourrait réguler l'accès de $E\sigma^{70}$ au promoteur du gène *mdoD*.

4) Influence des gènes *hns* et *himA* sur l'expression du gène *mdoD*.

Les protéines IHF et H-NS sont impliquées dans la mise en conformation de l'ADN et permettent sa condensation. Ces protéines abondantes se fixent sur des séquences spécifiques, qui restent malgré tout fortement dégénérées, et affectent les processus cellulaires nécessitant la dénaturation localisée de l'ADN double brins tels que la réplication, la recombinaison et la transcription. Ces protéines classées dans les facteurs régulateurs globaux affectent l'expression d'une grande variété de gènes dont certains ne paraissent pas avoir de relation entre eux. La protéine IHF reconnaît une séquence consensus ((A/T)ATCAANNNTTTR) dégénérée et permet la courbure de l'ADN pour rapprocher des séquences régulant l'expression d'un gène donné [Arfin et coll., 2000]. Une séquence IHF putative a été localisée dans l'ORF *b1423* en amont du gène *mdoD* aux coordonnées suivantes : -906 à -893.

Les protéines H-NS agissent en oligomères et se fixent préférentiellement sur des zones de courbure permettant la condensation de l'ADN. Dans 80% des cas, la présence des protéines H-NS inhibe l'expression du gène. Les gènes influencés par les protéines H-NS semblent préférentiellement être impliqués dans la biosynthèse de protéines de l'enveloppe et dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales [Hommais et coll., 2001].

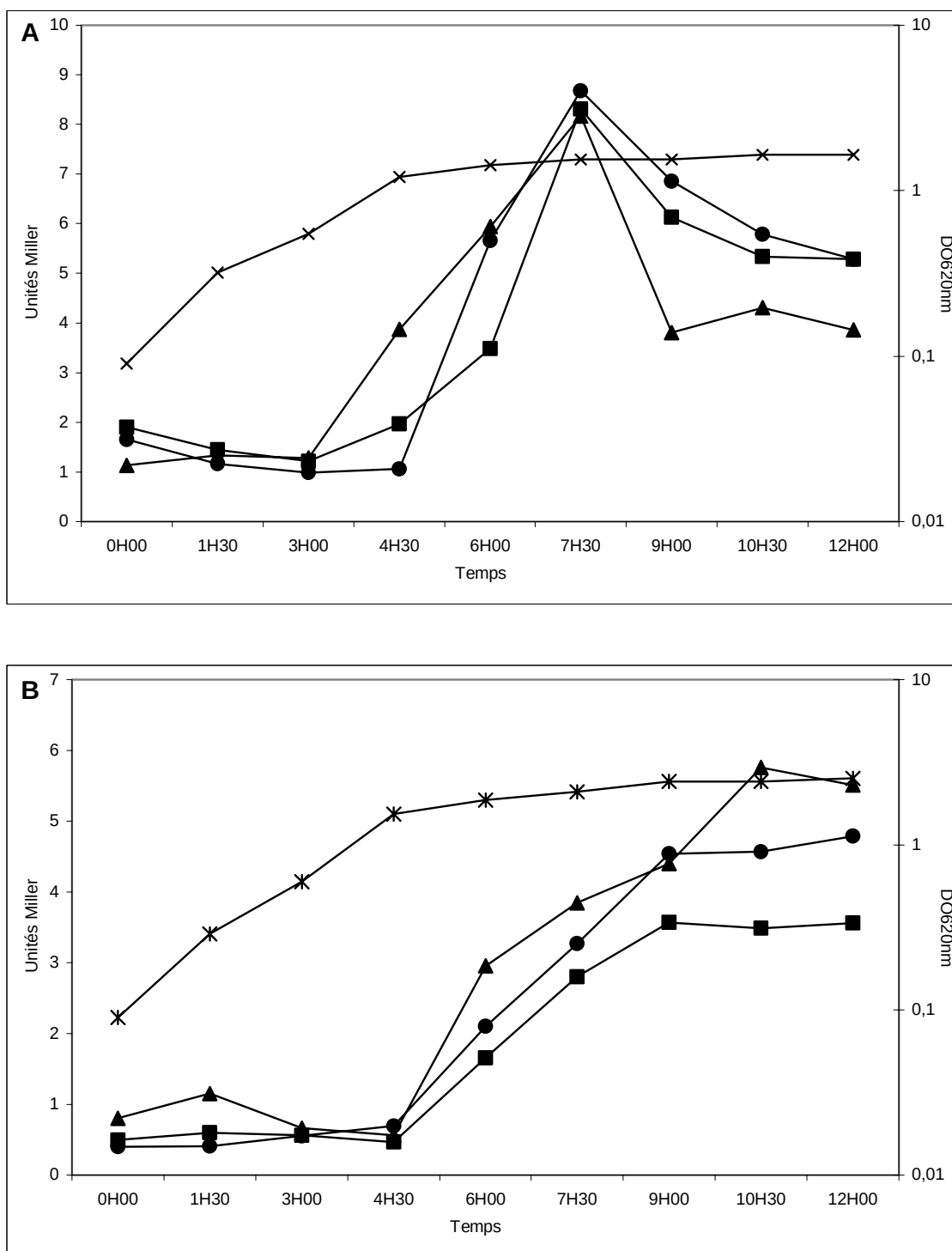


Figure 49 : Influences des facteurs IHF et H-NS sur l'expression des fusions. L'activité spécifique des fusions plasmidiques ont été mesurées dans des souches *himA* (cercle), *hns* (triangle) ou sauvage (carré) contenant la grande fusion *mdoD-lacZ* (A) ou la petite fusion *mdoD-lacZ* (B) sur un plasmide. La croissance est suivie à DO_{620nm} sur l'axe des ordonnées de droite. Les unités Miller sont notées sur l'axe des ordonnées de gauche.

L'activité spécifique de la β -galactosidase des fusions a été mesurée le long de la courbe de croissance à partir de souches dérivées de MC4100 inactivées dans le gène *hns* (NFB1950) ou *himA* (NFB1949) et portant le plasmide pNF1016 donnant respectivement les souches NFB1561 et NFB1560 ou le plasmide pNF574 donnant respectivement les souches NFB1482 et NFB1481.

L'analyse de l'activité spécifique de la β -galactosidase de la grande fusion *mdoD-lacZ* (pNF1016) ne montre pas de différence au niveau du facteur d'amplification (6 à 7 fois) entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (figure 49). L'augmentation de la grande fusion *mdoD-lacZ* semble être légèrement plus précoce dans la souche NFB1561(*hns*) (figure 49A). L'absence d'influence de la mutation *himA* sur l'activité de la grande fusion *mdoD-lacZ* implique que la séquence IHF putative n'intervient pas dans la régulation du gène *mdoD*.

L'analyse de l'activité spécifique de la β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* (pNF574) ne montre que de légères différences (figure 49B) d'augmentation lors de la phase stationnaire qui sont respectivement de 6 U, 7,5 U et 9 U pour les souches sauvage, NFB1481 et NFB1482.

Les influences enregistrées sur l'activité des deux fusions ne sont pas comparables à celles mesurées avec des gènes identifiés comme dépendant de H-NS ou de IHF [Hommais et coll., 2001], [Rowe et coll., 2000], [Galan et coll., 2001]. L'expression du gène *mdoD* n'apparaît pas être sous le contrôle des protéines H-NS ou IHF.

5) Etude structurale des OPG produits en phase exponentielle.

Les OPG provenant de la souche *mdoD217::cml*, *mdoD*⁺ et *rpoS* ont été extraits à partir de bactéries en phase exponentielle (DO_{620 nm} 0,5) (voir Matériels et Méthodes) et analysés sur colonne d'échange d'anions (DEAE Sephacel) et en spectrométrie de masse.

L'analyse sur une colonne d'échange d'anions des OPG provenant de bactéries sauvages en phase exponentielle ne montre pas d'hétérogénéité de profil caractéristique des OPG issus d'une souche mutante (figure 50A). Le profil possède 5 pics distincts élués aux mêmes forces ioniques que ceux identifiés lors de l'analyse des OPG produits en phase stationnaire par une souche sauvage.

Par contre, nous avons observé une répartition différente des OPG dans les cinq pics avec un glissement des OPG vers les pics II et III reffermant les OPG les moins chargés négativement.

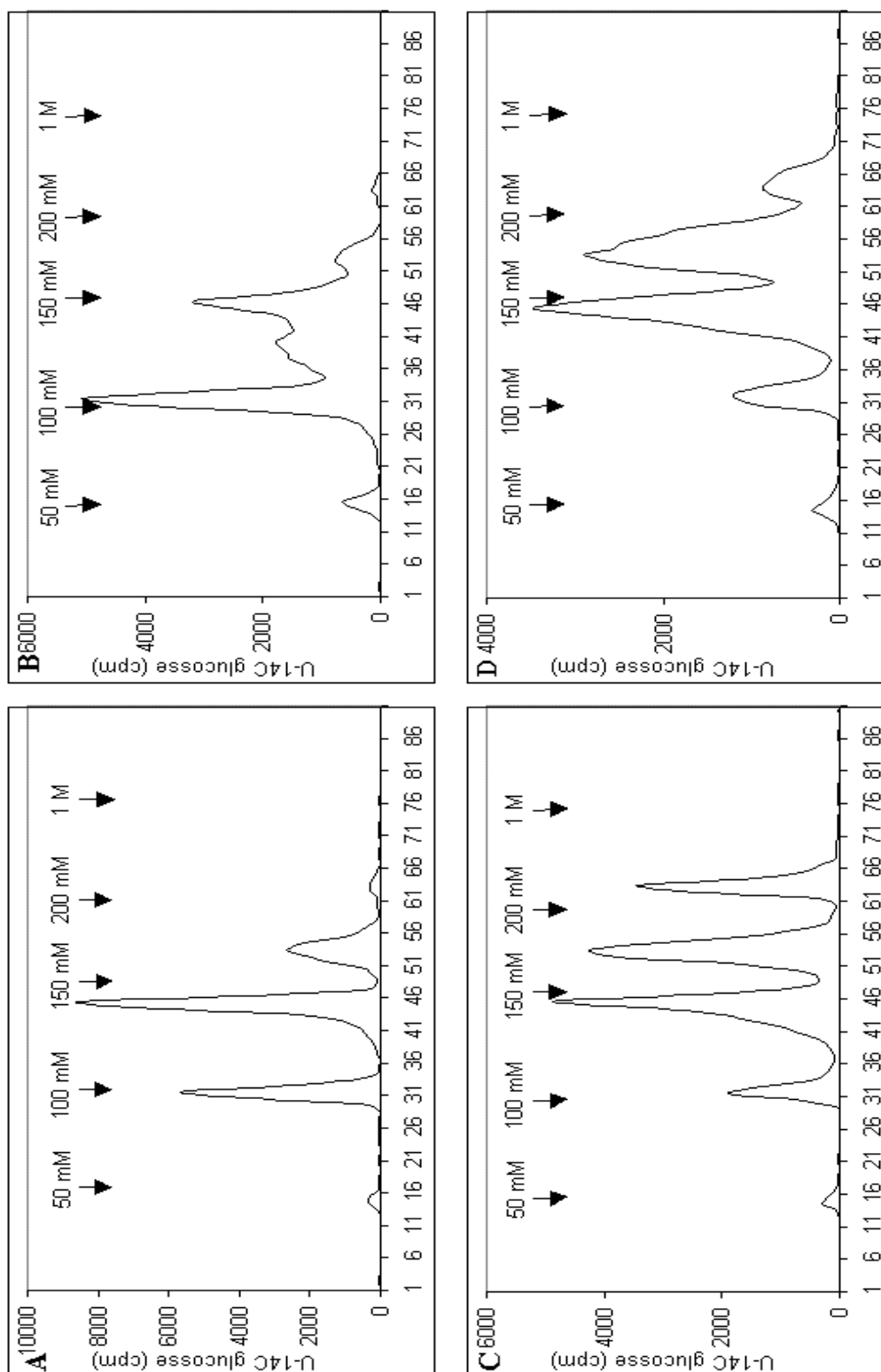
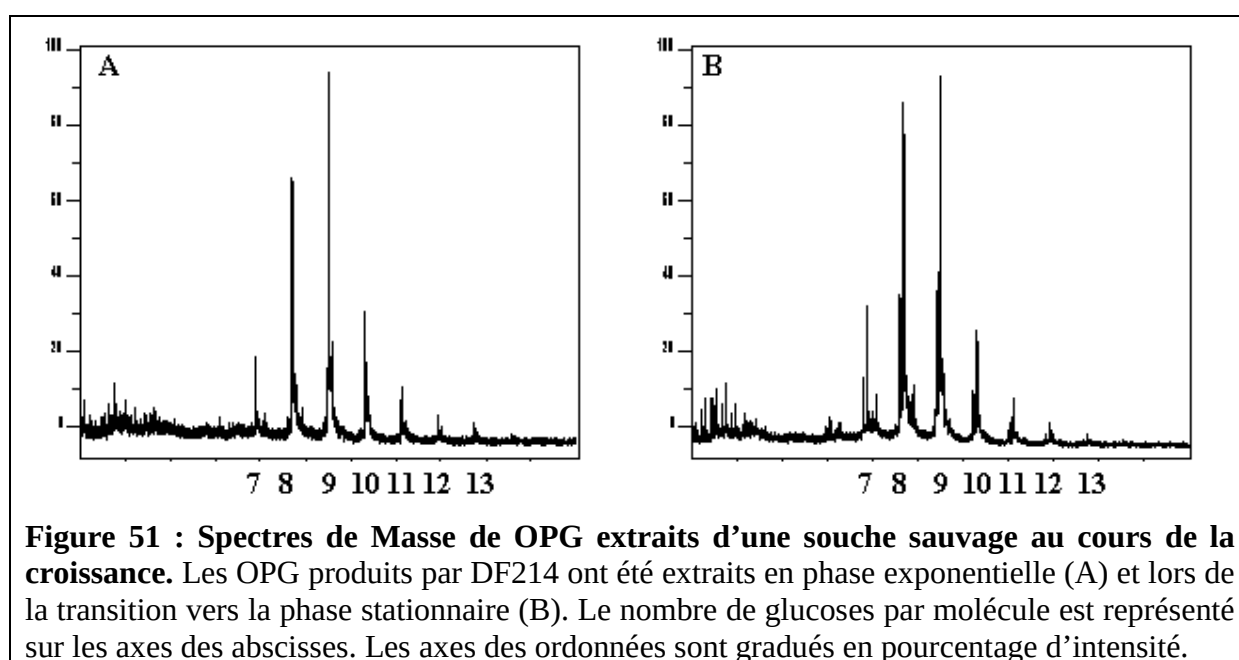


Figure 50 : Mesure du caractère anionique des OPG au cours de la courbe de croissance. Les OPG ont été extraits en phase exponentielle à partir de la souche sauvage DF214 (A), de la souche *mdoD217::cml* NFB1925 (B). Les OPG ont été extraits en début de phase stationnaire à partir de la souche sauvage DF214 (C) et de la souche *rpoS* NFB1802 (D). Les axes des ordonnées représentent la radioactivité (cpm) due au (U-¹⁴C) glucose. Les fractions sont notées sur les axes des abscisses.

En phase exponentielle, la biosynthèse du squelette glucosidique est en cours, tout comme la substitution qui doit être, en partie, postérieure à la biosynthèse du squelette, en particulier pour la substitution par les résidus de phosphoglycérol (voir résultats partie 3). Ceci pourrait expliquer le phénomène de glissement des OPG extraits de bactéries en phase exponentielle vers les pics les moins chargés en raison d'une substitution inachevée.

Pour vérifier cette absence d'hétérogénéité dans le squelette glucosidique ; ce dernier a été analysé en spectrométrie de masse (figure 51A). Le spectre des OPG désubstitués extraits en phase exponentielle ne montre pas de différence avec les OPG extraits de bactéries en phase stationnaire dans le cas d'une souche sauvage.



Les mêmes analyses sur colonne d'échange d'anions (figure 50D) et en spectrométrie de masse (figure 51B) ont été effectuées sur des OPG extraits d'une souche *rpoS* (NFB1802) lors de la transition vers la phase stationnaire ($DO_{620\text{ nm}}$ 0,1). Les profils sur la colonne d'échange d'anions et de spectrométrie de masse ne montrent pas de différences significatives avec ceux des OPG extraits en phase stationnaire.

Une analyse sur une colonne d'échange d'anions (figure 50B) des OPG extraits de la souche *mdoD217::cml* (NFB1925) en phase exponentielle montre un profil hétérogène caractéristique d'OPG extraits de la souche *mdoD217::cml* en phase stationnaire avec un glissement des OPG vers les pics les moins chargés probablement dû à une substitution inachevée.

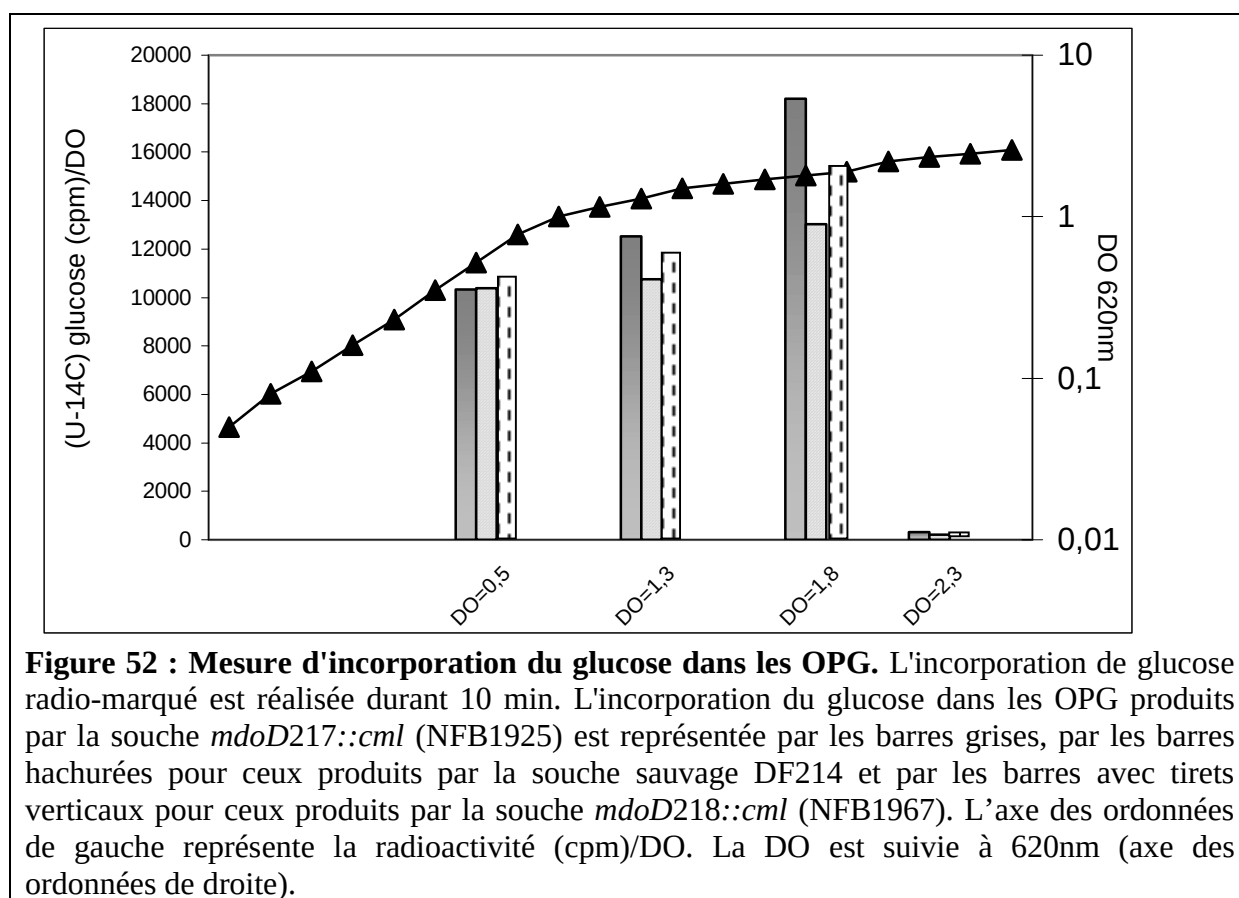
L'hétérogénéité des OPG en phase exponentielle et en phase stationnaire semble

identique pour une même souche, sauvage ou mutée dans le gène *mdoD*.

6) Activité spécifique de biosynthèse *in vivo* des OPG dans une souche *mdoD*.

Une analyse de l'activité de biosynthèse *in vivo* des OPG au cours de la phase de croissance a été réalisée pour appréhender l'influence du gène *mdoD* sur l'incorporation du glucose dans les OPG. Pour cela, nous avons mesuré l'incorporation de glucose radio-marqué pendant 10 min à différents moments de la courbe de croissance (DO_{620nm} 0,5 ; 1,3 ; 1,8 et 2,3) dans les souches DF214, NFB1925 et NFB1967.

Dans le cas d'une souche sauvage, l'incorporation du glucose dans les OPG augmente de manière parallèle à la courbe croissance durant la phase exponentielle indiquant une activité spécifique de biosynthèse constante dans les bactéries en phase exponentielle (figure 52). L'activité de biosynthèse des OPG est maintenue lors de la transition vers la phase stationnaire et au début de la phase stationnaire puis chute brutalement pour atteindre un niveau négligeable bien que le glucose soit toujours incorporé dans les cellules [Lacroix, 1989b].



Les mêmes analyses ont été effectuées avec la souche *mdoD217::cml* (NFB1925) et

mdoD218::cml (NFB1967) à différents moments du cycle cellulaire. Les incorporations du glucose dans les OPG des souche NFB1925 et NFB1967 suivent la courbe de croissance lors de la phase exponentielle de croissance jusqu'en début de phase stationnaire comme avec la souche sauvage, puis une chute brutale des incorporations dans les deux souches sont observées en même temps que dans la souche sauvage.

Par contre, des augmentations du taux d'incorporation de glucose de 15% et de 10% à DO_{620nm} 1,3 ; et de 27% et de 15% à DO_{620nm} 1,8 respectivement dans les souches *mdoD217::cml* et *mdoD218::cml* sont observées. La quantité totale d'OPG synthétisés étant identique dans les trois souches, l'augmentation d'incorporation de glucose dans les OPG en 10 min signifie que le complexe MdoG-MdoH synthétise plus rapidement le squelette glucosidique lors de la transition vers la phase stationnaire lorsque la protéine MdoD est inactive. La protéine MdoD pourrait interagir avec le complexe MdoGH et le ralentir dans son activité de biosynthèse des OPG pour réguler l'hétérogénéité des squelettes glucosidiques en cours de biosynthèse. La protéine MdoD n'a apparemment aucune influence sur l'arrêt de la biosynthèse des OPG.

III) Régulation osmotique du gène *mdoD*.

L'activité spécifique de la β -galactosidase des deux fusions *mdoD-lacZ* a été mesurée à partir de cellules incubées dans des milieux LOS d'osmolarités différentes (70mosM, 370mosM et 670mosM). L'osmolarité des milieux a été ajustée à l'aide de NaCl. L'activité spécifique de la β -galactosidase a été mesurée durant la croissance toutes les 1h30. Les résultats sont la moyenne des activités mesurées à partir trois clones indépendants possédant la petite ou la grande fusion *mdoD-lacZ* sur le chromosome.

1) Activité spécifique de la grande fusion *mdoD-lacZ*.

En prenant comme référence l'activité spécifique de la β -galactosidase mesurée à partir des cellules cultivées à basse osmolarité (70mosM), une augmentation de 1,5 fois est observée dans les cellules cultivées à 670mosM à DO_{620nm} 0,17 (figure 53). Cette tendance se confirme puisque que des facteurs d'augmentation de 1,8 et 2 sont mesurés dans les cellules en phase exponentielle (DO_{620nm} 0,35) respectivement cultivées à 370mosM et 670mosM.

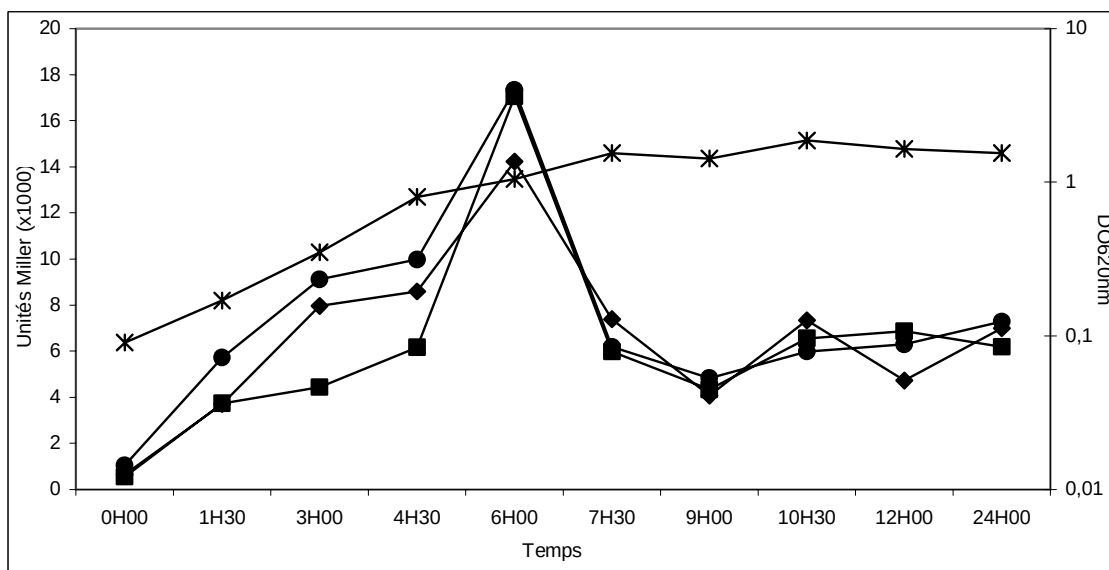


Figure 53 : Influences de l'osmolarité sur l'activité β -galactosidase de la grande fusion *mdoD-lacZ*. La fusion est portée sur le chromosome de la souche sauvage. Les cultures sont effectuées dans des milieux de 70 mosM (carré plein), de 370 mosM (losange plein) et de 670 mosM (cercle plein). La croissance est suivie à DO_{620nm} (croix)(axes des ordonnées de droite). Les unités Miller (axes des ordonnées de gauche) sont exprimées en μmol d'ONPG clivés /min/mg de protéine.

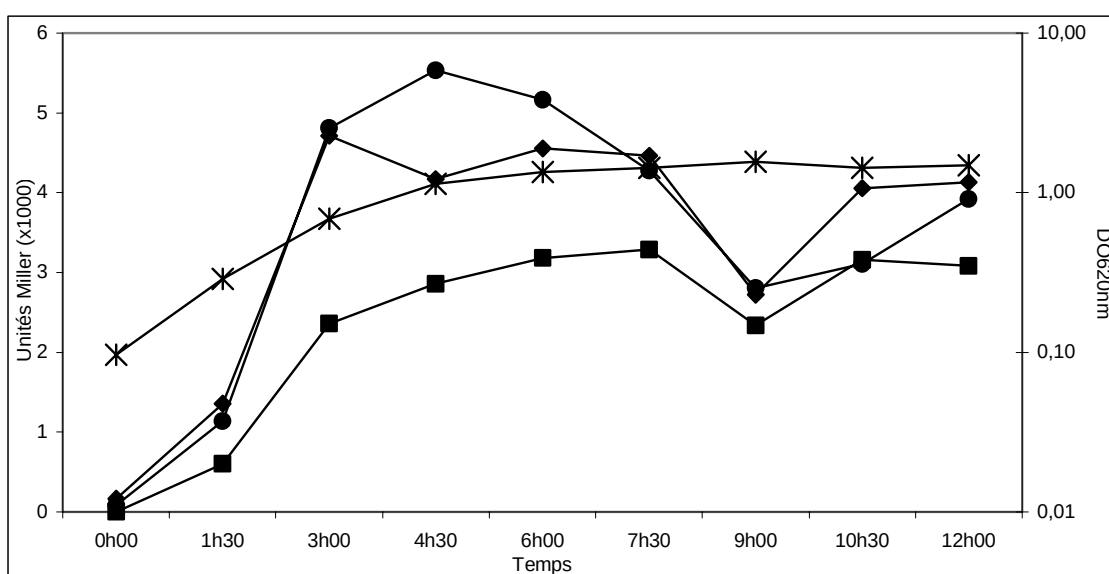


Figure 54 : Influences de l'osmolarité sur l'activité β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-LacZ*. La fusion est portée par le chromosome de la souche sauvage. Les cultures sont effectuées dans des milieux de 70 mosM (carré plein) 370 mosM (losange plein) et 670 mosM (cercle plein). La croissance est suivie à DO_{620nm} (croix) (axe des ordonnées de droite). Les unités Miller (axe des ordonnées de gauche) sont exprimées en μmol d'ONPG clivés/min/mg de protéine.

Lors de la transition vers la phase stationnaire (DO_{620nm} 1,05) des pics d'activité de la β -galactosidase avec des facteurs d'augmentation de 4,6, de 3,8 et de 2,6 par rapport à la phase exponentielle sont observés dans les cellules cultivées respectivement à 70 mosM, 370 mosM et 670 mosM. L'activité spécifique mesurée au moment du pic d'activité est identique pour les cellules cultivées à 70 et 670 mosM. L'activité de la β -galactosidase mesurée à partir des cellules cultivées à 370 mosM est 1,2 fois inférieure à celle mesurée à partir des cellules incubées dans les deux milieux précédents.

L'activité spécifique de la β -galactosidase diminue ensuite pour atteindre 7 U en phase stationnaire dans les trois conditions. L'activité spécifique reste alors stable tout au long de la phase stationnaire.

L'augmentation de l'osmolarité du milieu semble induire la grande fusion *mdoD-lacZ* dès la phase exponentielle.

2) Activité spécifique de la petite fusion *mdoD-lacZ*.

L'activité spécifique de la β -galactosidase mesurée dans des cellules cultivées à 370 mosM et 670 mosM est 2 fois plus importante que celle mesurée à partir des cellules incubées à 70 mosM durant la phase exponentielle (DO_{620nm} 0,3).

Ce facteur d'augmentation de 2 se maintient lors de la transition vers la phase stationnaire entre l'activité spécifique mesurée à partir de cellules cultivées à 670 mosM et à 370mosM avec celle mesurée à 70 mosM (figure 54). En phase stationnaire, l'activité spécifique de la β -galactosidase diminue légèrement dans les cellules cultivées à osmolarité 370mosM et 670mosM, contrairement à l'activité de la β -galactosidase dans les cellules cultivées à 70mosM.

Ces résultats montrent une augmentation plus précoce lors de la phase exponentielle et plus forte lors de la transition vers la phase stationnaire dans des milieux de haute osmolarité. L'activité semble proportionnée à l'osmolarité.

L'influence modérée de l'osmolarité sur l'activité spécifique de la grande fusion pourrait s'expliquer par le niveau de transcription du à $E\sigma^{70}$ absent avec la petite fusion et qui masquerait partiellement l'augmentation due à la transcription par $E\sigma^S$.

IV) Expression du gène *mdoD* face aux conditions de stress.

Les mesures de l'activité de la β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* obtenues dans une souche sauvage et une souche *rpoS* ont révélé une dépendance stricte du gène *mdoD*

vis à vis du facteur de transcription σ^S .

Pour cette raison, nous avons analysé l'activité de la β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* dans des cellules soumises au stress de privation de source de carbone, hyper osmotique, dont il a été démontré que le facteur σ^S était impliqué dans la réponse des bactéries face à ces deux conditions de stress, et au stress hyperoxydatif.

Pour chaque condition de stress, les bactéries sont cultivées dans un milieu minimum utilisé pour éviter l'apport d'osmoprotecteurs présents dans un milieu complexe.

Les conditions de stress ont été appliquées sur des cultures en phase exponentielle ($DO_{620\text{ nm}}$ 0,3) et en début de phase stationnaire pour le stress hyperosmotique. Le stress hyperoxydatif a été initié par l'ajout de H_2O_2 à 15 nM et le stress hyperosmotique par l'ajout de NaCl à 0,3 M.

Pour appliquer le stress de privation de source de carbone, les bactéries cultivées en présence de glycérol ont été filtrées et lavées trois fois par du milieu M63 sans glycérol puis incubées sous agitation dans un milieu M63 sans glycérol. Le glycérol a été choisi comme source de carbone pour éviter l'influence de la régulation du métabolisme du glucose sur l'expression de la petite fusion *mdoD-lacZ*. L'activité de la β -galactosidase a été mesurée aux temps 0, 8, 15, 60 et 120 min sur des cultures stressées et non stressées. Les résultats sont la moyenne des mesures obtenues avec les trois clones indépendants contenant la petite fusion *mdoD-lacZ* chromosomique.

1) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors d'un stress hyperoxydatif.

L'activité de la β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* est diminuée d'un facteur quatre après 15min de stress hyperoxydatif par rapport à une culture non stressée (figure 55A). Cette activité reste stable jusqu'à la fin de l'expérience.

La diminution de l'activité de la β -galactosidase pourrait s'expliquer par le fait que l'ARN régulateur d'OxyS, impliqué dans la réponse face au stress hyperoxydatif, réprime la traduction du facteur σ^S [Zhang et coll., 1998]. Ces résultats sont donc en accord avec le fait que le gène *mdoD* est sous le contrôle du facteur σ^S .

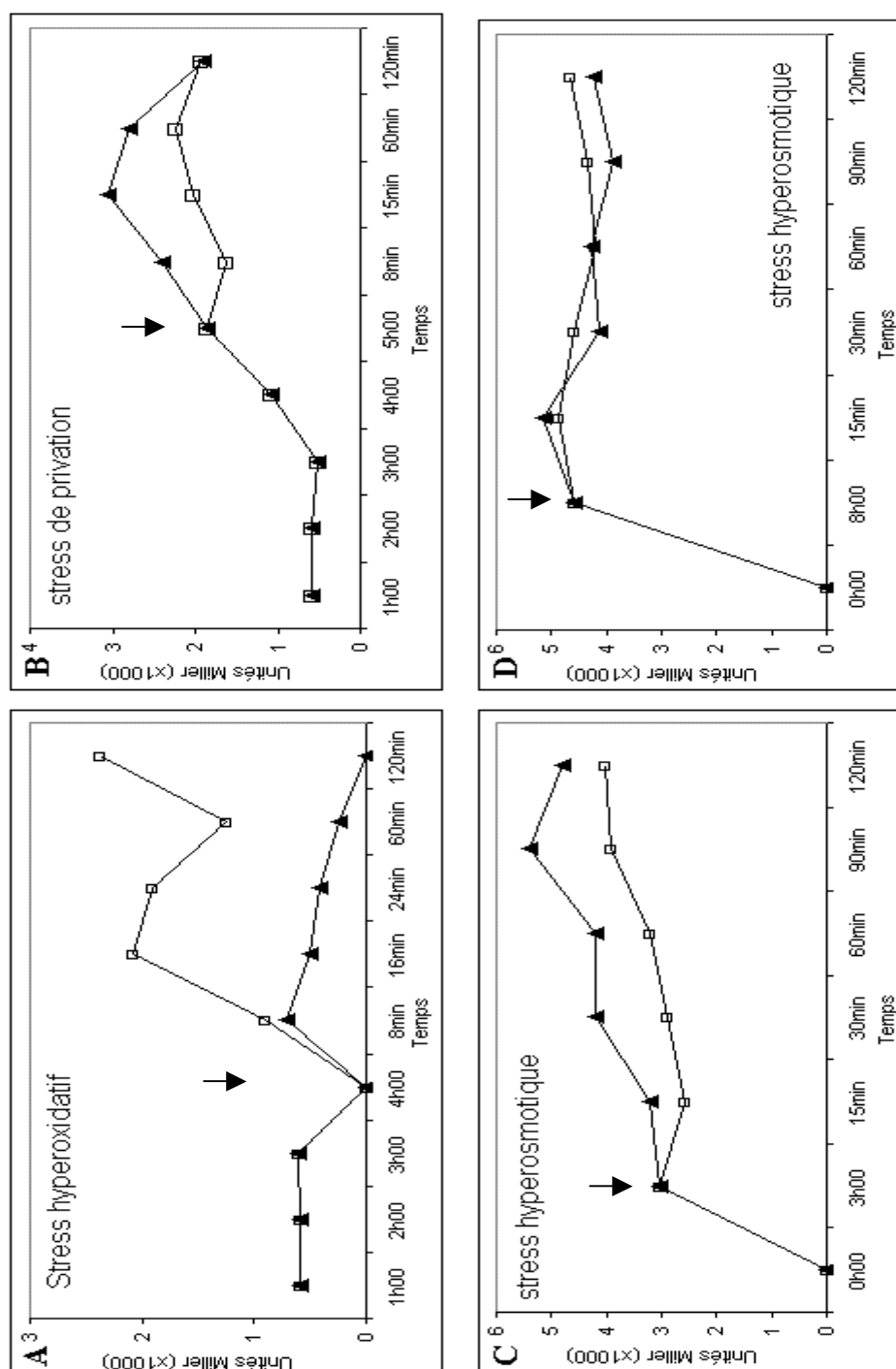


Figure 55 : Mesure de l'activité β -galactosidase de la petite fusion *mdoD-lacZ* au cours de stress oxydatif (A) et de privation de source de carbone (B) appliqués en phase exponentielle et d'un stress hyper osmotique appliqué lors la phase exponentielle (C) et de la phase stationnaire (D). L'activité a été mesurée sur les cultures stressées (triangle plein) et sur les cultures non stressées (carré vide). La petite fusion *mdoD-lacZ* est portée par le chromosome. La croissance est suivie à DO_{620nm} (l'axe des ordonnées de droite). Les unités Miller sont notées sur l'axe des ordonnées de gauche. La flèche symbolise le moment où les stress ont été appliqués.

2) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors d'un stress hyper osmotique

Lors du stress hyperosmotique appliqué en phase stationnaire, l'activité de la β -galactosidase est identique dans les cultures stressées et non-stressées (figure 55CD). Par contre, une faible augmentation de 1,3 durant les 120 premières minutes de stress par rapport à la culture non stressée est observée lors de l'application du stress en phase exponentielle. L'expression du gène *mdoD* semble être faiblement augmentée lors d'un stress hyperosmotique en phase exponentielle. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus avec les cultures stabilisées à haute osmolarité.

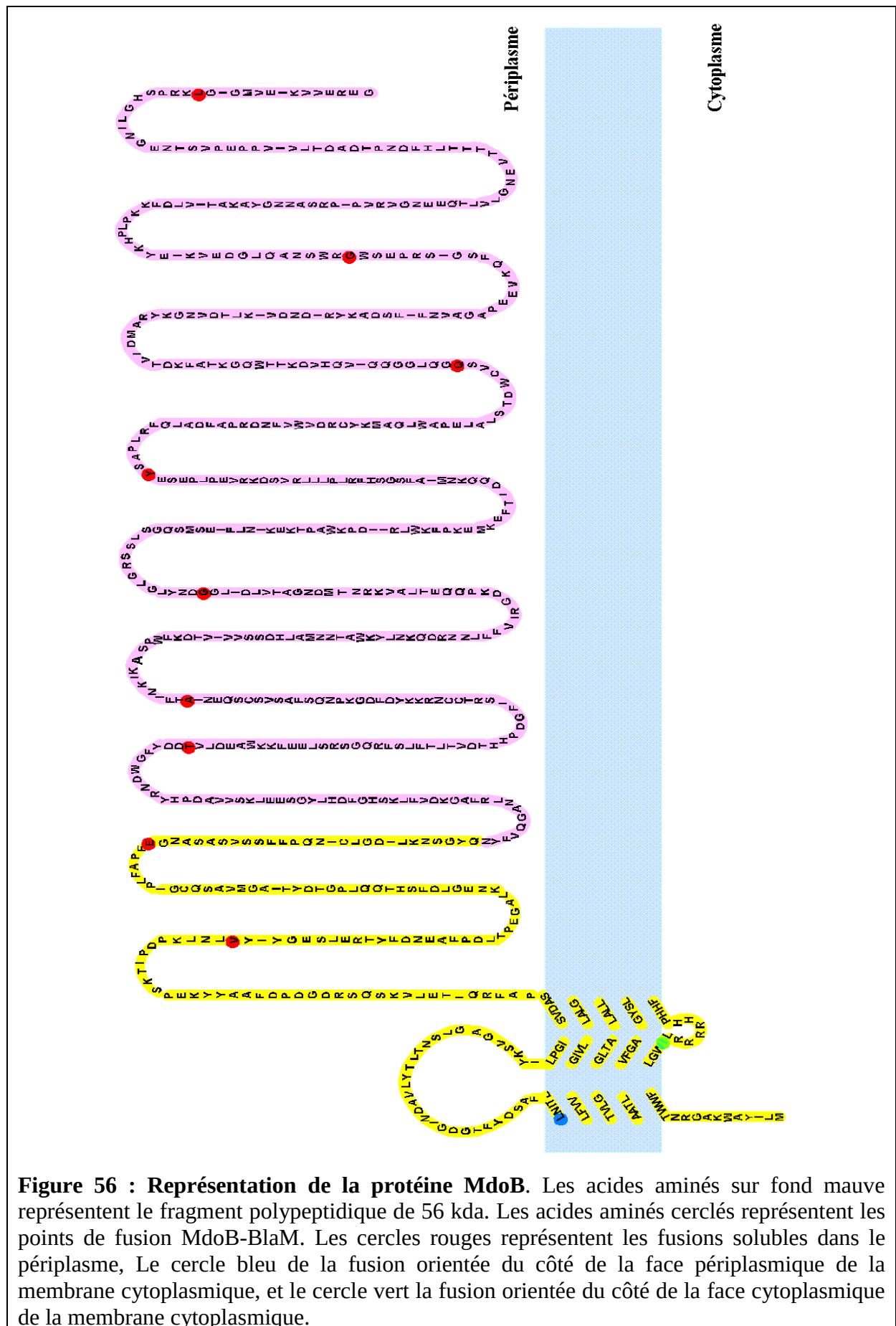
3) Mesure de l'activité de la β -galactosidase lors de la privation de source de carbone.

Une augmentation de l'activité de la β -galactosidase de 1,5 fois est mesurée dès les 8 premières minutes de la privation de source de carbone (figure 55B). Cette augmentation se maintient durant les 15 premières minutes, puis diminue pour retrouver un niveau équivalent à celle mesurée à partir de cultures non stressées. L'expression du gène *mdoD* semble être faiblement augmentée de manière transitoire lors de la privation de source de carbone.

Ainsi parmi ces trois stress testés, seul le stress hyperoxydatif semble avoir une influence significative sur l'expression du gène *mdoD*.

Partie 3 : Identification du gène impliqué dans l'activité phosphoglycérol-transférase II périplasmique.

Deux activités phosphoglycérol-transférases ont été identifiées chez *E. coli*. Une phosphoglycérol-transférase I membranaire catalyse le transfert de résidus de phosphoglycérol d'origine membranaire vers les OPG. Un substrat artificiel, l'arbutine, peut servir d'accepteur. Le transfert d'un résidu de phosphoglycérol d'un phosphatidylglycérol vers les OPG entraîne la formation de diacylglycérol, toxique pour la cellule, qui est immédiatement phosphorylé par la diacylglycérol-kinase (codée par le gène *dgk*) pour donner de l'acide phosphatidique [Jackson et coll., 1984]. Dans un mutant *dgk* et en présence d'arbutine, le diacylglycérol est accumulé, entraînant l'arrêt de la croissance. Cette sélection a permis d'obtenir un mutant de l'activité de la phosphoglycérol-transférase I par insertion aléatoire d'un transposon. Dans un tel mutant, l'accumulation de diacylglycérol ne se réalise plus permettant la formation de petites colonies. Le transposon a été localisé dans un gène nommé *mdoB* [Jackson et coll., 1984]. L'activité de la phosphoglycérol-transférase II périplasmique a été identifiée antérieurement [Goldberg et coll., 1981]. L'activité physiologique de la phosphoglycérol-transférase II serait de transférer des résidus de phosphoglycérol provenant d'OPG solubles déjà substitués sur d'autres molécules d'OPG. Le phosphatidylglycérol ne peut pas être le substrat de cette phosphoglycérol-transférase II. Le gène de cette activité n'a pas été caractérisé. Les mesures de l'activité phosphoglycérol-transférase II à partir d'extraits totaux cellulaires soniqués provenant d'une souche *mdoB* n'ont pas révélé de différence avec la souche sauvage [Jackson et coll., 1984], suggérant que les deux activités de phosphoglycérol-transférase soient codées par deux gènes distincts. La substitution par des résidus de phosphoglycérol fait donc intervenir deux protéines dont une membranaire assurant la substitution primaire et une périplasmique assurant la substitution secondaire [Goldberg et coll., 1981]. Des résidus de phosphoglycérol ont aussi été identifiés chez *S. meliloti*. Ces substituants proviennent des phospholipides de la membrane. Une phosphoglycérol-transférase (CgmB) a été mise en évidence [Wang et coll., 1999]. Le gène *cgmB* ne montre que 17% d'identité avec le gène *mdoB* et la protéine n'est apparemment pas ancrée dans la membrane. Wang et coll. suggèrent que ce gène puisse être homologue à la phosphoglycérol-transférase II de *E. coli*.



A) Topologie et localisation de la protéine MdoB

I) Topologie de la protéine MdoB dans la membrane cytoplasmique.

Des fusions aléatoires entre les gènes *mdoB* et *blaM* ont été générées par digestion du gène *mdoB* avec l'exonucléase III pour appréhender la topologie de la protéine MdoB à travers la membrane cytoplasmique. Ce travail a été réalisé par Eric Lanfroy lors de sa thèse [Lanfroy, 1997].

Dix fusions en phase recouvrant la quasi-totalité de la protéine MdoB ont été générées aux positions suivantes : 152, 214, 293, 351, 433, 516, 561, 639, 734 et 750.

Deux fusions localisées supplémentaires ont été générées aux positions 28 et 84. Le numéro correspond au premier acide aminé modifié par insertion du gène '*blaM*' (figure 56). Seule la souche portant la fusion en position 84 se révèle sensible à l'ampicilline. Cette souche possède donc l'activité de la β -lactamase sur la face cytoplasmique de la membrane cytoplasmique. Par contre, l'ensemble des autres fusions en position 28, 152, 214, 293, 351, 433, 516, 561, 639, 734 et 750 confèrent une résistance à l'ampicilline, pour des colonies isolées, identique au témoin positif. Les activités de la β -lactamase de ces fusions sont donc situées sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique.

Une analyse prédictive de la topologie de la protéine MdoB a été réalisée à l'aide du programme TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>). Cette analyse révèle la présence de 4 segments transmembranaires situés entre les acides aminés 5 et 200 et une large partie C-terminal hydrophile. L'analyse de l'activité de la β -lactamase confirme 3 segments transmembranaires : un premier compris entre les acides aminés 12 à 33, le second est compris entre les acides aminés 65 et 74 et le troisième entre les acides aminés 80 et 99. La partie C-terminal se trouve du côté périplasmique et la partie N-terminale (11 acides aminés) du côté cytoplasmique de la membrane cytoplasmique.

II) Localisation de protéine MdoB.

Pour confirmer la localisation de la protéine MdoB, Les cellules portant les différentes fusions ont été fractionnées et l'activité de la β -lactamase a été mesurée pour les fractions solubles correspondant au périplasmique [Lanfroy, 1997]. Les activités périplasmiques pour les fusions aux positions 28 et 84 ne représentent que 17% de l'activité totale confirmant l'association de ces protéines hybrides MdoB-BlaM à la membrane cytoplasmique. Par

contre, les activités de la β -lactamase produites par les fusions aux positions 152, 214 et 293 sont localisées au niveau de la fraction soluble périplasmique. Ceci implique une localisation périplasmique de ces protéines hybrides MdoB-BlaM.

Ces résultats supposent un rapide clivage situé apparemment entre les acides aminés 99 et 152 des protéines hydrides MdoB-BlaM. Pour vérifier si la protéine MdoB subit ce même clivage, une visualisation sur gel dénaturant de la protéine MdoB marquée au P^{32} a été réalisée [Lanfroy, 1997]. L'auto-radiogramme a révélé la présence d'une bande intense d'un poids moléculaire apparent de 48 kda et d'une bande de faible intensité de 86 kda correspondant à la protéine MdoB entière. La bande 48 kda correspondrait à la partie C-terminale de la protéine MdoB.

B) Mesure de l'activité phosphoglycérol-transférase II.

I) Purification de la phosphoglycérol-transférase II.

L'activité de la phosphoglycérol-transférase II périplasmique a été identifiée à partir d'enzymes partiellement purifiées provenant de 600g de cellules d'*E. coli* [Goldberg et coll., 1981]. Le poids moléculaire apparent de la phosphoglycérol-transférase II a été estimé à 56 000 par chromatographie de filtration sur gel. La méthode de purification décrite par Goldberg et coll. [Goldberg et coll., 1981] ne permet pas de comparer facilement plusieurs souches ou conditions. Nous avons donc décidé d'adapter un nouveau protocole de purification partielle des protéines périplasmiques au test de phosphoglycérol-transférase II (voir Matériels et & Méthodes) afin de l'appliquer facilement à différentes souches.

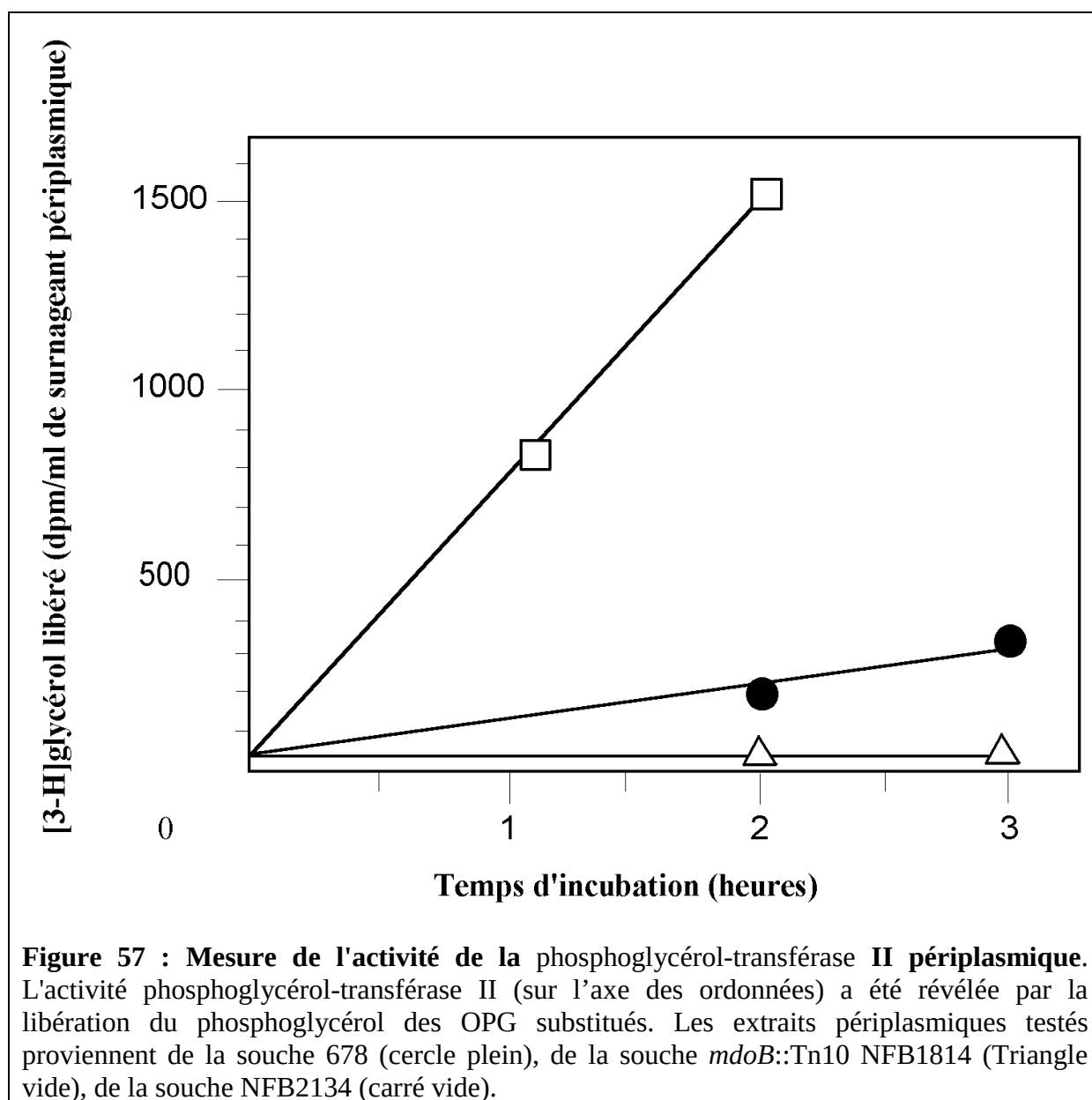
Les cellules de la souche 678 et leurs dérivés, provenant de 100 ml de culture, sont soumis à un traitement à l'EDTA permettant la libération spécifique des protéines périplasmiques (voir Matériels et Méthodes). Les extraits périplasmiques ont été partiellement purifiés sur une colonne de filtration sur gel G-50 possédant une masse d'exclusion de 50 000. Les protéines exclues de poids moléculaire supérieur à 50 000 ont été concentrées et utilisées par effectuer le test l'activité de la phosphoglycérol-transférase II.

II) Mesure de l'activité de la phosphoglycérol-transférase II *in vitro*.

La phosphoglycérol-transférase II est aussi capable de libérer le phosphoglycérol sous forme cyclique, *in vitro*, lorsqu'elle est incubée avec une faible concentration de molécules d'OPG substituées par le phosphoglycérol [Goldberg et coll., 1981]. C'est cette activité de libération du phosphoglycérol, caractéristique de l'activité phosphoglycérol-transférase II, qui

a été utilisée pour identifier le gène codant cette protéine.

L'activité de libération du phosphoglycérol a été mesurée à partir d'extraits périplasmiques provenant de la souche 678 et NFB1814 (*mdoB*::Tn10). Une activité d'hydrolyse de $0,25 \pm 0,01$ U/mg de protéine/h pour les extraits issus de la souche sauvage 678 est mesurée alors que l'activité d'hydrolyse provenant des extraits de la souche *mdoB*::Tn10 est résiduelle ($0,02 \pm 0,01$ U/ mg de protéine / h) (figure 57).



Lorsque le même test a été effectué à partir d'extraits totaux de cellules préparées comme dans la méthode décrite par Jackson *et al* [Jackson et coll., 1984], des activités d'hydrolyse de $0,70$ U/mg de protéine/h pour les extraits issus de la souche sauvage et de $0,30$

U/mg de protéine/h pour les extraits issus de la souche *mdoB* sont mesurées. Une diminution de l'activité dans une souche *mdoB::Tn10* est tout de même observée, mais de manière moins conséquente qu'avec les extraits périsplasmiques partiellement purifiés. L'activité importante dans les extraits soniqués provenant de la souche *mdoB::Tn10* révèle une activité d'hydrolyse non spécifique.

Le plasmide pNF604 (*mdoB*⁺) a été introduit dans la souche 678 donnant la souche NFB2132 (figure 57). L'activité d'hydrolyse mesurée à partir d'extraits périsplasmiques partiellement purifiés montre une amplification de 25 fois (5,37 U/mg de protéine/ h) par rapport à l'activité issue d'une souche 678.

La libération de phosphoglycérol à partir d'OPG substitués révélant la présence de la phosphoglycérol-transférase II, le gène *mdoB* est donc responsable de l'activité phosphoglycérol-transférase II périsplasmique. Le gène *mdoB* code une protéine MdoB qui est ancrée dans la membrane cytoplasmique exposant la large partie C-terminale du côté périsplasmique [Jackson et coll., 1983], puis une partie des protéines MdoB sont clivées pour libérer un fragment C-terminal soluble dans l'espace périsplasmique. Cette protéine tronquée responsable de l'activité phosphoglycérol-transférase II périsplasmique a été nommé MdoB'.

III) Substitution des OPG par le phosphoglycérol *in vivo*.

La substitution en deux étapes suggère une action différée de la protéine MdoB'. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé le caractère anionique des OPG nouvellement synthétisés conféré par les résidus de phosphoglycérol et de succinate. Pour cela, un échantillon (5ml) de la souche DF214 en phase exponentielle cultivée dans un milieu LOS dépourvu de glucose a été incubé durant 10 min sous agitation avec du (U-¹⁴C) glucose incorporé spécifiquement dans les OPG. Ces OPG synthétisés durant 10 min ont été analysés sur une colonne d'échange d'anions (DEAE Sephacel à pH7,4 ; voir Matériels et Méthodes) et comparés aux OPG synthétisés après 24 heures de culture.

Les OPG synthétisés par une souche sauvage durant un cycle de croissance complet sont séparés en 5 pics distincts sur une colonne DEAE Sephacel. Le pic I ne possède pas de substituant anionique et les pics II à V correspondent à des molécules possédant des rapports charge sur masse différents pour chaque pic. Les proportions des cinq pics sont respectivement les suivantes : 1-2%, 15%, 40%, 35% et 10% (figure 58A). Le profil des OPG synthétisés durant 10 min ne présente que 4 pics, le pic V n'étant pas présent. Les proportions des 4 pics sont respectivement les suivantes : 13%, 40%, 42% et 5% (figure 58B).

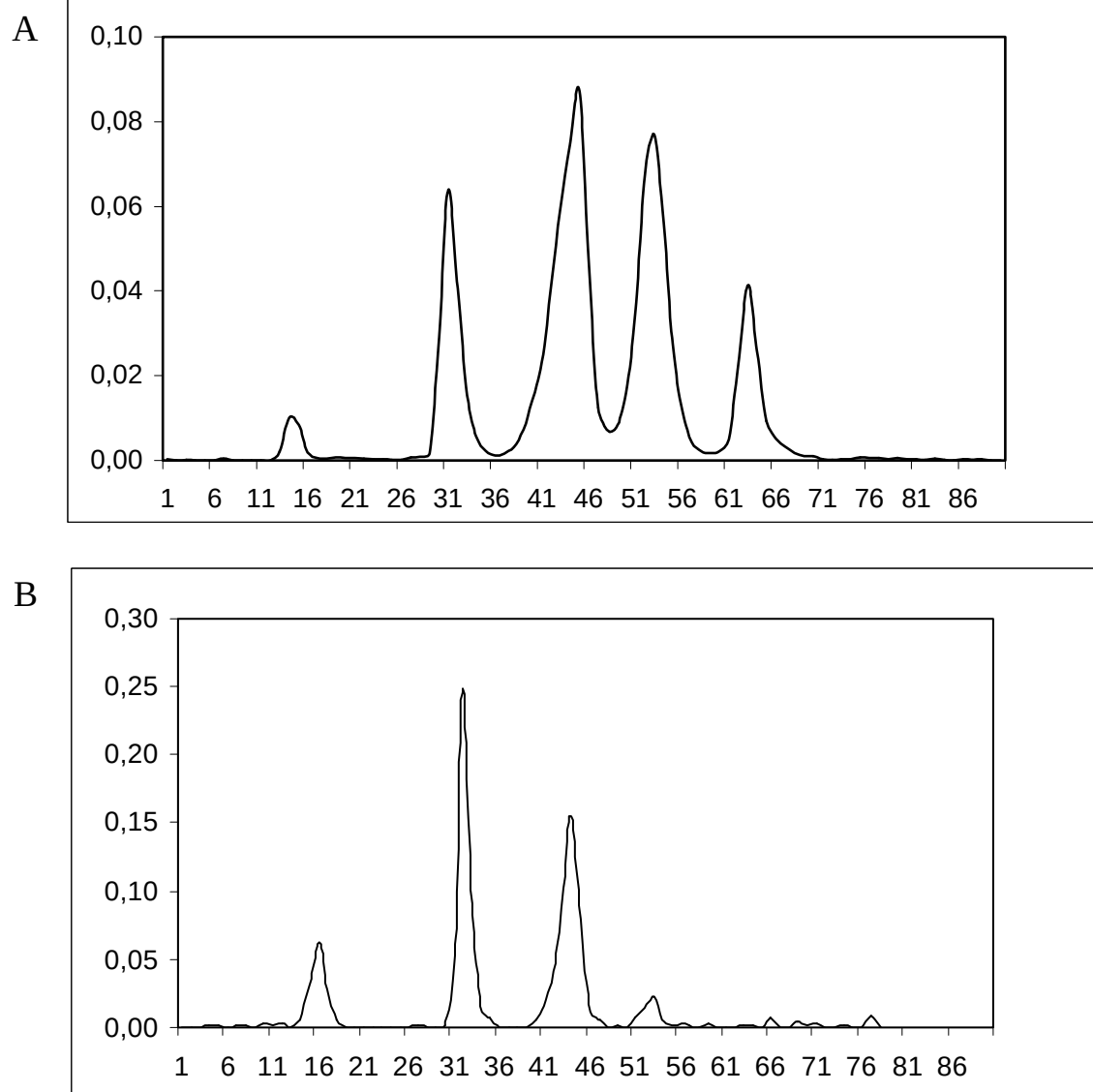


Figure 58 : Caractères anioniques des OPG synthétisés après 10min. Les OPG de la souche sauvage sont extraits en phase stationnaire (A) et après 10 min (B) d'incubation avec le glucose radiomarqué. Les fractions éluées sont représentées sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente le pourcentage des OPG.

Cette distribution révèle un glissement des OPG vers les pics correspondant aux OPG dont les rapports charge sur masse sont les plus faibles. Le pic IV des OPG synthétisés en 10 min ne représente que 5% au lieu de 35%, Le pic II 40% au lieu de 15% et le pic I, refermant les OPG neutres, 13% au lieu de 1-2% par rapport aux OPG synthétisés durant 24 heures. Ce même glissement a été observé précédemment avec la séparation des OPG extraits à partir de cellules en phase exponentielle (figure 49) sur une colonne d'échange d'anions qui montre un profil intermédiaire entre celui des OPG synthétisés en 10 min et en 24heures d'incubation. Les proportions des cinq pics sont respectivement 2%, 27%, 48%, 21% et 2%.

Les fractions des pics II et III des OPG synthétisés durant 10 min ont été récupérées et les résidus de succinate ont été éliminés par un traitement alcalin. Les OPG issus des pics II et III ont été ensuite analysés séparément sur une colonne d'échange d'anions, afin de déterminer la part de la charge due aux résidus de phosphoglycérol et celle due aux résidus de succinate.

Pour les OPG du pic II, 60% des OPG désuccinylés ont été élués dans le pic I (OPG neutres) et 40% dans le pic II. Les OPG désuccinylés présents dans le pic I ne possédaient initialement que des résidus de succinate. Par contre, Les 40% d'OPG désuccinylés restés dans pic II possédaient uniquement des résidus de phosphoglycérol. Le pic II renfermant les OPG synthétisés après 10 min possède donc 60% d'OPG substitués uniquement par des résidus de succinate et 40% d'OPG substitués uniquement par des résidus de phosphoglycérol.

Pour les OPG du pic III, 60% des OPG désuccinylés ont été élués dans le pic I (OPG neutres) et 40% dans le pic II. L'absence d'OPG désuccinylés dans le pic III implique qu'aucune molécule substituée uniquement par des résidus de phosphoglycérol n'a pu être mise en évidence. Le pic III renferme donc 60% d'OPG substitués uniquement par des résidus de succinate et 40% d'OPG substitués à la fois par des résidus de phosphoglycérol et de succinate.

65% des OPG synthétisés durant 10 min possèdent des résidus de succinate, or 80% des OPG synthétisés durant un cycle de croissance complet sont substitués par des résidus de succinate. Ces résultats suggèrent que la substitution par les résidus de succinate s'effectue juste après ou pendant la synthèse du squelette glucosidique. La protéine MdoC doit être probablement très proche ou en interaction avec le complexe MdoGH.

Les trois profils d'élution des OPG extraits à différents moments de la courbe de croissance suggèrent que la substitution par le phosphoglycérol soit séquentielle : la phosphoglycérol-transférase I substitue les OPG en cours de synthèse ou ceux proche de la membrane cytoplasmique en utilisant les phosphatidylglycérols comme substrat et la phosphoglycérol-transférase II substitue les OPG solubles lors de la biosynthèse et probablement ultérieurement à cette synthèse en utilisant les OPG substitués précédemment comme substrat.

Discussion

A) Biosynthèse du squelette glucosidique.

I) Mécanisme d'action de la protéine MdoH.

1) Biosynthèse de la chaîne linéaire.

La protéine MdoH est une protéine contenant un domaine glycosyltransférase membranaire. Elle utilise l'UDP-glucose comme substrat pour catalyser *in vitro* la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2. L'analyse des amas hydrophobes HCA (Hydrophoby Clusters Analyzes) des séquences des glycosyltransférases a permis de les classer en plusieurs familles [Saxena et coll., 1995] (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>). Le profil HCA de la protéine MdoH, effectué par B. Henrissat, permet de la classer parmi les glycosyltransférases de la famille 2. Ces glycosyltransférases utilisent un NDP-glucoside d'anométrie α et synthétisent des liaisons glucosidiques d'anométrie β . Ces enzymes sont dites inversantes. Saxena et coll. [Saxena et coll., 1995] ont mis en évidence des résidus d'acides aspartiques très conservés dans les glycosyltransférases. Deux acides aspartiques sont regroupés dans un domaine A et le troisième est situé dans un domaine B. Le profil HCA de la protéine MdoH a permis d'identifier ces trois acides aspartiques situés aux acides aminés 285, 346 et 449 dans la partie C2 (figure 14).

Nous avons entrepris une mutagenèse par insertion aléatoire d'un épitope EP31BamHI sur la protéine MdoH afin de délimiter les domaines nécessaires à l'activité de biosynthèse des OPG *in vivo*. De plus, les trois acides aspartiques susceptibles être impliqués dans les domaines actifs de la protéine MdoH ont été échangés en alanine par mutagenèse dirigée.

L'analyse de l'activité des différents allèles portant un épitope a révélé des différences dans la biosynthèse des OPG qui ont permis de définir une organisation grossière de la partie C2 cytoplasmique de la protéine MdoH (figure 14). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que certaines différences d'activité de biosynthèse soient dues à une instabilité de certaines protéines.

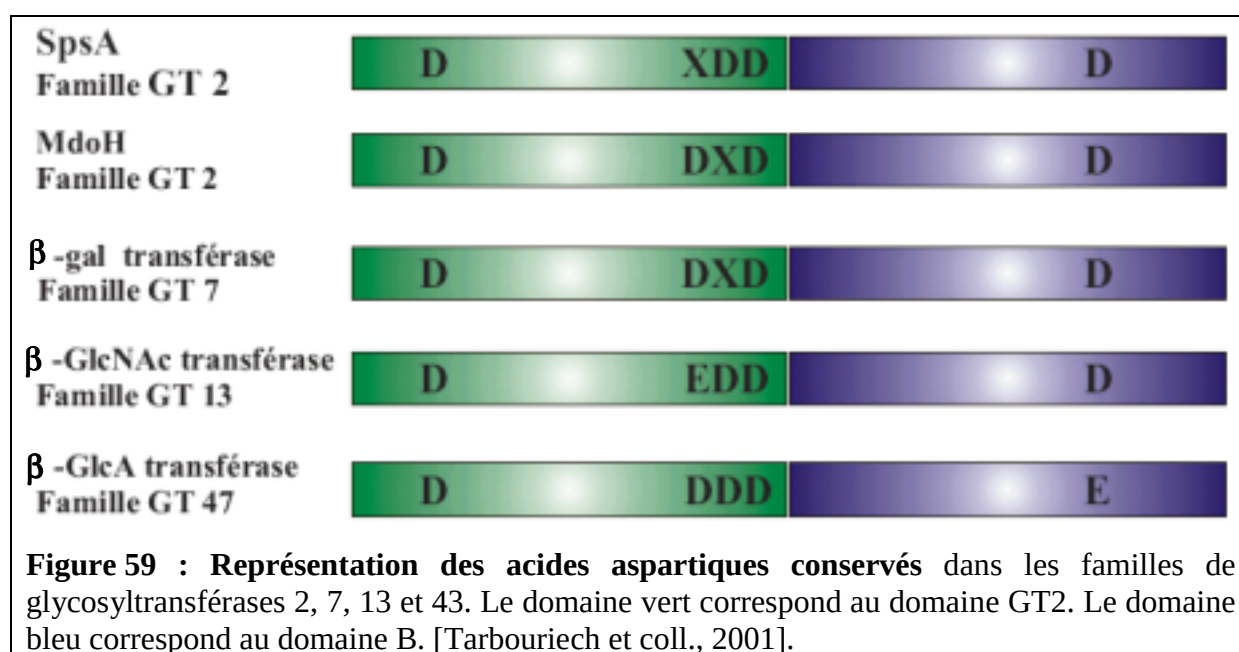
La partie C2 est donc constituée de deux domaines séparés par une région située entre les acides aminés 380 et 400. Le premier domaine serait compris entre le deuxième segment transmembranaire et l'acide aminé 380. Il correspondrait au domaine A défini par Saxena et coll. [Saxena et coll., 1995] et renfermerait les deux acides aspartiques D285 et D346. Le second domaine serait compris entre l'acide aminé 400 et le troisième segment

transmembranaire. Il correspondrait au domaine B et renfermerait l'acide aspartique D449.

La nécessité de ces acides aspartiques dans l'activité de la protéine MdoH a été évaluée par l'échange des ces trois acides aspartique en trois alanines. Le remplacement d'un seul de ces trois acides aspartiques par une alanine abolit totalement l'activité de biosynthèse des OPG *in vivo*. Ces trois acides aspartiques correspondent bien aux acides aspartiques conservés dans tous les domaines glycosyltransférases. Ces acides aspartiques seraient le siège de l'activité de biosynthèse de la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2.

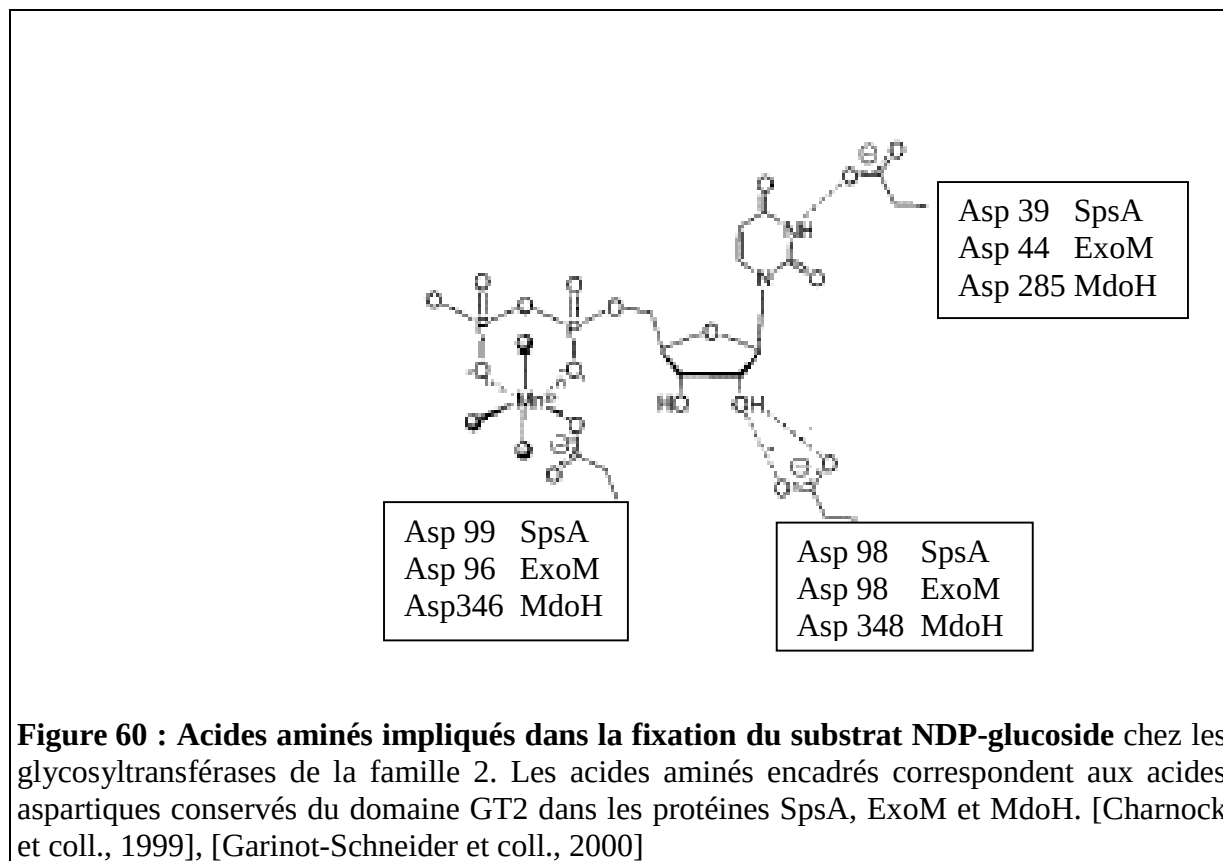
La base de données pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>) a permis de définir un large domaine GT2 trouvé dans les domaines de glycosyltransférases de type 2 correspondant au domaine A défini par Saxena et coll. [Saxena et coll., 1995]. Des domaines A très proches du domaine GT2 retrouvés dans les autres glycosyltransférases des familles 7, 13 et 43 ont été nommés respectivement GT7, GT13 et GT43 [Charnock et coll., 2001] (figure 59). Le domaine GT2 de la protéine MdoH a été prédit entre les acides aminés 245 et 430 de la protéine MdoH. Cette localisation du domaine GT2 est sensiblement identique à celle déduite par l'analyse de l'influence des insertions d'épitope dans la protéine MdoH.

Des analyses cristallographiques, les profils HCA des glycosyltransférases et la mutagenèse dirigée envers les acides aminés conservés ont permis de déterminer le rôle de quatre à cinq acides aspartiques conservés dans ces familles de glycosyltransférases inversantes [Tarbouriech et coll., 2001] [Garinot-Schneider et coll., 2000].



Le Domaine GT2 (ou domaine A) forme une cavité permettant de capter le NDP-

glucoside. Ces études ont permis de localiser deux acides aminés cruciaux pour l'activité de glycosyltransférase regroupés dans deux sites (D...DXD) séparés d'une centaine d'acides aminés. Un premier acide aspartique situé dans une boucle à l'extrémité C-terminale du feuillet β 2 permet la reconnaissance de l'uracile ou de la thymine du NDP-glucoside.



L'acide aminé D39 de la protéine SpsA interagit avec l'uracile de l'UDP-glucose (figure 60). La mutagenèse dirigée de l'acide aspartique D44 de la protéine ExoM ont permis de suggérer une l'interaction entre l'acide aspartique 44 et l'uracile de l'UDP-glucose. Le motif DXD situé dans la boucle à l'extrémité C-terminale du feuillet β 4 permet de reconnaître le groupement pyrophosphate par l'intermédiaire d'ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} et le ribose. Le motif est sous forme $_{97}TDD_{99}$ dans la protéine SpsA, sous forme $_{96}DDD_{98}$ dans la protéine ExoM. Ce motif renferme généralement au moins deux acides aspartiques qui ne présentent pas la même importance vis à vis de la reconnaissance du NDP-glucoside. L'étude cristallographique a montré que le troisième acide aminé D99 de la protéine SpsA permet de reconnaître le groupement pyrophosphate du NDP-glucoside par l'intermédiaire de l'ion Mn^{2+} . L'acide aminé D98 interagirait avec le ribose [Charnock et coll., 1999]. Le profil HCA et la prédiction de la structure secondaire de la protéine ExoM ont permis de prédire que

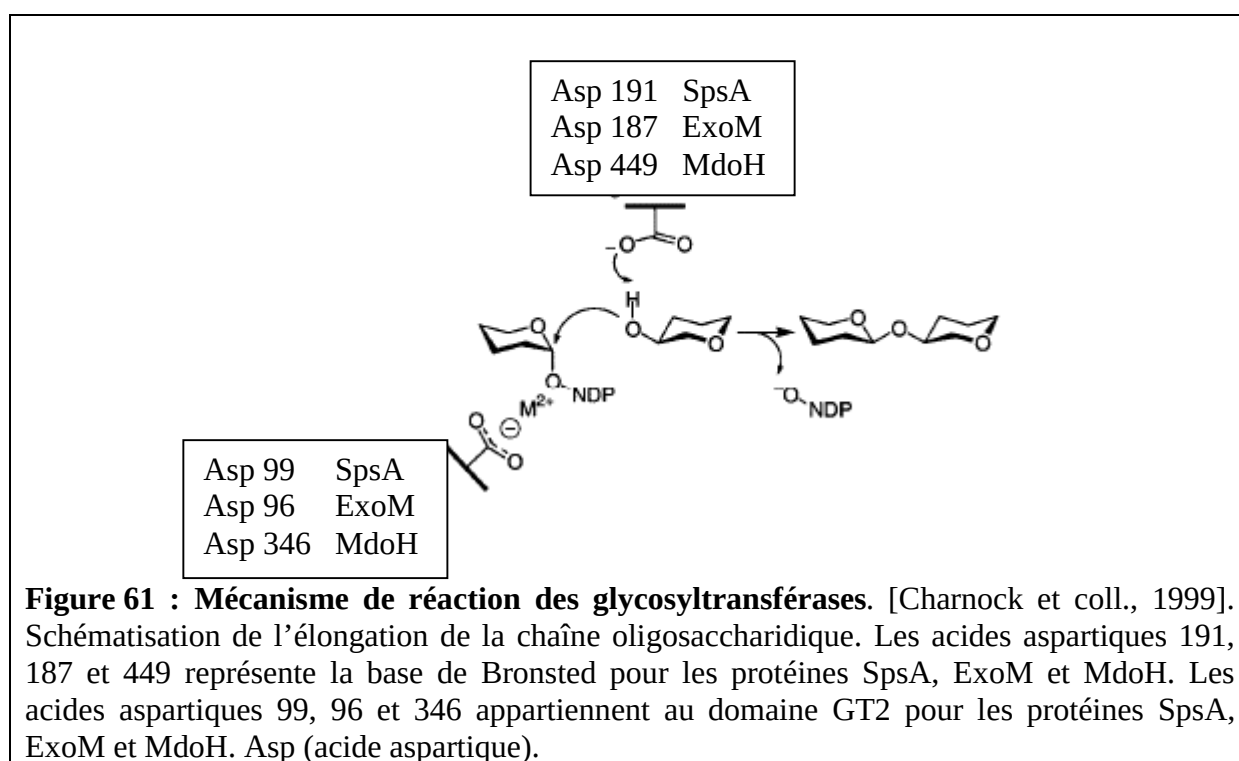
l'acide aspartique D96 correspondrait à l'acide aspartique D99 de la protéine SpsA. Les mutagenèses dirigées des trois acides aminés du motif DXD de la protéine ExoM en alanine ont montré la nécessité absolue du premier acide aminé D96 dans la reconnaissance de la liaison pyrophosphate de l'UDP-glucose, tandis que les acides aminés D97 et D98 contribueraient à une stabilisation de la fixation du substrat en se fixant au ribose [Garinot-Schneider et coll., 2000]. Le motif DXD semble être inversé dans ces deux protéines SpsA et ExoM. Ces acides aspartiques forment le domaine GT2 de reconnaissance du substrat [Tarbouriech et coll., 2001].

Par comparaison avec ces deux études, le profil HCA de la protéine MdoH fourni par B. Henrissat et la stricte nécessité des acides aspartiques D285 et D346 de la protéine MdoH pour la biosynthèse des OPG, nous pouvons suggérer que l'acide aspartique 285 de la protéine MdoH permettrait la reconnaissance de l'uracile de l'UDP-glucose. L'acide aspartique D346 du motif ${}_{346}\text{DAD}_{348}$ de la protéine MdoH interagirait avec le groupement pyrophosphate de l'UDP-glucose par l'intermédiaire de l'ion Mg^{2+} (figure 60). Pour l'interaction avec le ribose, c'est l'acide aspartique D97 adjacent qui semble interagir avec le ribose dans la protéine SpsA. Dans la protéine ExoM, Les mutagenèses dirigées des deux acides aspartiques D97 et D98 suggèrent l'implication de ces deux acides amines dans la stabilisation du substrat, par contre, il est difficile de déterminer lequel des deux acides aspartiques correspond exactement à l'acide aspartique D97 de la protéine SpsA. Dans le cas du motif DXD de la protéine MdoH, une alanine est adjacente à l'acide aspartique D346. L'absence de charge de cet acide amine suggère un rôle plus important de l'acide aspartique D348 dans l'interaction avec le ribose.

Les glycosyltransférases de la famille 2 catalysent la formation des liaisons de type β à partir de NDP-glycoside liés en α . Le mécanisme de réaction est considéré comme une substitution nucléophile engendrant une forme ionique intermédiaire de l'accepteur. Un acide aminé de charge négative est donc nécessaire pour l'activer par déprotonation (figure 61). L'accepteur activé effectue ensuite une attaque nucléophile sur le carbone C1 impliqué dans la liaison O-glucosidique du NDP-glycoside. L'étude de la protéine SpsA par cristallographie et l'analyse du profil HCA ont prédit l'implication de l'acide aspartique 191 dans la réaction de transfert d'un résidu glycosidique du NDP-glycoside vers l'accepteur. L'analyse des profils HCA d'autres glycosyltransférases a permis de définir une fonction carboxylique portée par un acide aspartique dans la majorité des cas ou par un acide glutamique dans la famille 43 [Tarbouriech et coll., 2001]. L'acide aspartique D449 prédit par le profil HCA de la protéine MdoH correspondrait bien à cet acide aspartique consensus puisque son

remplacement par un résidu d'alanine abolit l'activité *in vivo* de la protéine MdoH (figure 61).

Ces acides aminés cruciaux impliqués dans la fixation de l'UDP-glucose et l'activité de synthèse d'oligosaccharides liés en β 1,2 ont été clairement identifiés dans la protéine MdoH. La protéine MdoH est donc une protéine contenant un domaine glycosyltransférase inversante qui permet l'élongation de la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 à partir de l'extrémité non réductrice.



L'UDP-glucose est fixé dans le domaine GT2 au niveau de l'uracile par l'acide aspartique D285, au niveau du groupe pyrophosphate par l'acide aspartique D346 en coopération avec un ion Mg^{2+} et probablement au niveau du ribose par l'acide aminé D348. L'amorce située dans le domaine B subirait l'attaque nucléophile de l'acide aspartique D449 engendrant la déprotonation du carbone C2. Ce carbone 2 activé provoquerait à son tour une attaque nucléophile sur le carbone C1 de l'UDP-glucose et engendrerait le transfert du résidu de glucose sur la chaîne linéaire.

Le clonage de la région centrale C2 sous un promoteur inductible permettrait d'obtenir la région centrale purifiée pour effectuer dans un premier temps des tests de fixation de l'ACP ou de l'UDP-glucose pour appréhender les zones d'interactions de ces éléments avec les protéines MdoH mutées dans l'un des trois acides aspartiques conservés. Puis la co-cristallisation de cette région C2 avec l'UDP-glucose, ou/et l'ACP permettrait d'une part de déterminer précisément les acides aminés impliqués dans la fixation du substrat et dans la

réaction de glycosyltransférase et d'autre part de localiser les acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'ACP.

Si le site de fixation du NDP-glucoside et le site catalytique sont identifiés, le mécanisme de synthèse ne s'en trouve pas totalement élucidé. Les études structurales et biochimiques de plusieurs protéines ne permettent pas de déterminer si une protéine est processive (cellulase) ou non processive (HasA de type I).

Récemment, deux hypothèses ont été émises pour expliquer la processivité, en particulier lors de la synthèse de la cellulose. Carpita et coll. [Carpita et coll., 1998] suggèrent que deux glycosyltransférases orientés en tête bêche coopèrent pour ajouter un résidu de cellobiose sur la chaîne de cellulose. Par ailleurs, Tarbouriech et coll. [Tarbouriech et coll., 2001] suggèrent que le domaine GT2 impliqué dans la fixation de l'UDP-glucoside soit aussi capable d'être le siège d'une activité catalytique de transférase afin d'ajouter deux résidus à la fois. D'autres éléments orientent probablement la biosynthèse des polymères vers un mécanisme processif ou non processif. A ce jour, il est donc difficile de déterminer si la biosynthèse de la chaîne linéaire de résidus de glucose des OPG s'effectue de manière processive ou non processive à partir de la comparaison des profils HCA. Un élément intrinsèque de la glycosyltransférase ou supplémentaire pourrait tirer sur la chaîne oligosaccharidique et permettre le glissement du résidu nouvellement ajouté du site GT2 au site B. Ce mouvement donnerait une dynamique à la biosynthèse des polysaccharides favorable à un mécanisme processif.

2) Implication de la protéine MdoH dans la translocation des OPG.

La recherche de motif dans les différentes protéines de *E. coli* a révélé la présence d'acides aminés conservés entre des protéines des systèmes PTS (PtsG, NagE, MalX, GlvC) et la protéine MdoH (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Complete_Genomes/mot2html?EC0021) (figure 62).

La protéine PtsG contient un domaine IIC transmembranaire impliqué dans la translocation du substrat à travers la membrane cytoplasmique et un domaine IIB cytoplasmique impliqué dans le couplage phosphorylation-transport du substrat. Le domaine PTS IIC possède huit segments transmembranaires et est relié au domaine PTS IIB par une zone charnière chez *E. coli* [Buhr et coll., 1992]. La similitude de séquence entre ces 5 protéines se situe au niveau de l'extrémité carboxylique du domaine PTS IIC.

280	VGGIMISAALTSFLTGTITEPIEFSEFMFVAPILYIIHAI	PtsG
260	VGGMLLSVAVTAFLTGVTEPLEFLFMFLAPLLYLLHAL	NagE
321	IKGLLISGLIACVVGGTTEPLEFLFLFVAPVLYVIHAL	MalX
394	VAGLLIPATLTAMLVGITEPLEFTFLFISPLLFAVHAV	GlvC
506	MHPVHRAVFLTGVMYSLSAPLWFMFLALSTALQVVHAL	MdoH

Figure 62 : Alignement de la protéine MdoH avec les protéines du système PTS chez *E. coli*. Les gènes *ptsG*, *nagE*, *malX*, et *glvC* codent respectivement les protéines transmembranaires EII pour l'entrée du glucose, de la N-acétylglucosamine, du maltose et de l'arbutine. Les acides aminés verts sont identiques dans les 5 séquences. Les acides aminés bleus sont conservés dans les 5 séquences.

Les acides aminés conservés sont situés entre les acides aminés 280 et 317 pour le domaine IIC de la protéine PtsG et entre les acides aminés 506 et 543 pour la protéine MdoH. Les acides aminés 280 à 300 et les acides aminés 310 à 317 sont retrouvés respectivement dans les segments transmembranaires VII et VIII du domaine PTS IIC ; tandis que les acides aminés 301 à 309 sont situés du côté périplasmique. Les acides aminés 506 à 513 sont situés du côté cytoplasmique dans la protéine MdoH et les acides aminés 514 à 543 sont situés dans le segment III de la protéine MdoH. Plusieurs mutations ponctuelles ont été localisées dans cette région de la protéine PtsG. Des échanges d'acides aminés dans le glycolle 281, l'isoleucine 283, l'alanine 288, la leucine 289, le motif GITE et le glycolle G320 diminuent la spécificité et l'affinité du domaine IIC pour le glucose [Begley et coll., 1996], [Ruijter et coll., 1992], [Buhr et coll., 1992], [Notley-McRobb et coll., 2000]. Seul les acides aminés 283 et 289 de la protéine PtsG impliqués dans le transport gardent le même caractère hydrophobe dans les cinq protéines (PtsG, NagE, MalX, GlvC et MdoH). De plus, un motif PLXFXF est conservé dans ces cinq protéines. Aucune mutation n'a été identifiée dans ce motif lors des études des protéines PTS. De manière générale, l'effet des mutations obtenues dans les protéines PTS est expliqué par un élargissement ou une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal formé par le domaine IIC permettant à une plus large gamme de substrat d'utiliser ce canal pour l'entrée dans le cytoplasme [Notley-McRobb et coll., 2000]. Les segments transmembranaires renfermeraient des propriétés de transport et de spécificité de substrat pour les protéines PTS. Il est suggéré que cette poche hydrophobe créée par les segments transmembranaires faciliterait le glissement des sucres lors de la translocation du substrat à travers la membrane cytoplasmique [Oh et coll., 1999]. Par analogie, les huit segments transmembranaires de la protéine MdoH pourraient former un canal qui permettrait la translocation de la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2. Les acides aminés du segment transmembranaire III de la protéine MdoH, notamment le motif PLXFXF, pourrait

jouer un rôle important dans le mécanisme de translocation. Des mutations dirigées dans ce site ainsi qu'une mutagenèse localisée par PCR dans cette région du segment transmembranaire III permettraient d'appréhender l'importance de ce segment et en particulier de ce motif dans la biosynthèse des OPG.

3) Influences des boucles périplasmiques.

La protéine MdoH montre très peu de surface en contact avec le périplasma (figure 14). Deux boucles majeures d'une trentaine d'acides aminés orientés vers le périplasma ont été localisées entre les segments transmembranaires I et II puis III et IV. La nécessité de la protéine MdoG dans la biosynthèse des OPG permet d'envisager une interaction des protéines MdoG et MdoH au niveau de ces boucles périplasmiques. Une mutagenèse dirigée par insertion d'un épitope a été réalisée dans la deuxième boucle périplasmique pour appréhender l'importance de cette dernière.

L'insertion d'un oligopeptide de quatre acides aminés dans la deuxième boucle périplasmique a permis de générer deux allèles qui diffèrent par l'orientation de l'épitope. La protéine MdoH-QW562 possède un épitope formé de quatre acides aminés PKLG en place des deux acides aminés Q561 et W562. La protéine MdoH-Q561 possède un épitope de quatre acides aminés PSLG en place de l'acide aminé Q561. Les deux protéines diffèrent par la présence du tryptophane et le caractère ionique du deuxième acide aminé de l'épitope : une charge négative dans la protéine MdoH-QW562, une sérine dans la protéine MdoH-Q561.

L'insertion de deux oligopeptides de quatre acides aminés dans la seconde boucle périplasmique de la protéine MdoH qui ne diffèrent que d'un seul acide aminé a montré que la présence d'une sérine dans la protéine MdoH-Q561 perturbe plus la biosynthèse des OPG (activité inférieure à 10%) que la présence d'une lysine (charge négative) et l'absence d'un tryptophane réunies (activité de 70%) dans la protéine MdoH-QW562.

La présence d'un groupement OH de la sérine pourrait perturber fortement les interactions entre les protéines MdoH et MdoG ou obstruer le canal permettant la translocation des OPG.

Une mutagenèse localisée par PCR dans les deux boucles périplasmiques permettrait de déterminer les acides aminés impliqués dans l'interaction de la protéine MdoH avec la protéine MdoG ou d'autres protéines du complexe Mdo.

II) rôle de la protéine MdoG : Hypothèses.

Une mutagenèse par insertion aléatoire d'épitope a été entreprise sur la protéine MdoG

comme dans le cas de la protéine MdoH. Malheureusement, l'obtention d'insertions d'épitope en phase a été plus difficile. Ceci semble être dû aux propriétés intrinsèques du phage λ Tn*phoA/in* dans lequel l'efficacité de transposition du transposon Tn*phoA/in* et la production d'un lysat λ semblent diminuées. Quatre insertions de l'épitope EP31 *Bam*HI dans la protéine MdoG et la modification des 89 acides aminés en C-Terminal ont été réalisées. L'insertion au niveau de l'arginine 195 ne provoque qu'une faible diminution. Par contre, l'élimination d'environ 80 acides aminés en C-terminal (protéines MdoG215 et MdoG-T4658) provoquent une diminution drastique de la biosynthèse des OPG *in vivo*. Ceci suggère une importance de la région C-terminale dans la fonction ou dans la conformation de la protéine MdoG, même si nous ne pouvons pas exclure que l'insertion de l'épitope EP31 *Bam*HI diminue la stabilité de protéine MdoG dans le périplasme.

L'analyse des liaisons glucosidiques des OPG synthétisés par les souches portant les allèles mutants de la protéine MdoG n'a pas révélé de différences structurales. Ce maintient de la structure des OPG dans les souches portant les différents allèles mutants dans la protéine MdoG et l'absence de synthèse d'OPG dans un mutant *mdoG* nul renforce l'hypothèse que les protéines MdoG et MdoH coopèrent de manière intime lors de la biosynthèse du squelette glucosidique. La protéine MdoG pourrait reconnaître la protéine MdoH au niveau des boucles périplasmiques et assister la protéine MdoH lors de la translocation de la chaîne linéaire vers la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. L'implication de la protéine MdoG dans la synthèse des liaisons de type β -1,6 est aussi renforcée par la découverte de l'implication de la protéine MdoD, paralogue de la protéine MdoG, dans le maintient du taux de branchement. Cette activité de branchement pourrait être une condition nécessaire à la translocation des OPG vers le périplasme. La protéine MdoG formerait des liaisons de type β -1,6 en tirant sur la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 émergente de la protéine MdoH.

Des mutagenèses localisées dans le gène *mdoG* ainsi que la co-cristallisation de la protéine MdoG avec des OPG sont en cours de réalisation. Ces expériences permettront d'identifier les acides aminés impliqués dans la fonction de la protéine MdoG. Dans le cas de l'identification de mutations ponctuelles dans les boucles périplasmiques de la protéine MdoH inhibant la biosynthèse des OPG, la recherche de mutations ponctuelles suppressives sur le gène *mdoG* permettrait d'identifier les acides aminés impliqués dans les interactions entre ces deux protéines. L'utilisation de produits chimiques engendrant des pontages chimiques entre les protéines dans une souche DF214 en présence ou en absence de glucose exogène pourrait

mettre en évidence les interactions de la protéine MdoG avec la protéine MdoH ou la chaîne oligosaccharidique émergente.

III) Quel rôle pour la protéine MdoD ?

1) Influence de l'inactivation du gène *mdoD* sur la biosynthèse des OPG.

Le gène *mdoD* n'est pas indispensable à la biosynthèse des OPG puisqu'une souche portant l'allèle *mdoD218::cml* est tout à fait capable de synthétiser des OPG en quantité identique à celle d'une souche sauvage. Par contre, les OPG issus d'une souche *mdoD218::cml* possèdent des OPG plus hétérogènes dans la taille et le taux de branchement qui contiennent 13 types de squelettes glucosidiques allant de 6 à 18 résidus glucose par molécule contre seulement 8 types de squelettes glucosidiques allant de 6 à 13 résidus de glucose par molécule dans la souche sauvage. La détermination des types de liaisons entre les résidus de glucose a révélé un doublement du nombre de résidus de glucose liés en β -1,2 par rapport aux points de branchement (résidus de glucose liés en β -1,2,6) pour les OPG provenant de la souche *mdoD218::cml*.

Ces influences de l'inactivation du gène *mdoD* sur la structure du squelette glucosidique sont renforcées par l'influence de l'allèle *mdoD217::cml*. L'allèle *mdoD217::cml* permettrait apparemment la formation d'une protéine MdoD217 de 400 acides aminés (45,91kda) influençant la biosynthèse des OPG, puisque la souche *mdoD217::cml* synthétise apparemment des OPG plus longs que ceux de la souche *mdoD218::cml*. 17 types de squelettes glucosidiques allant de 7 à 23 résidus de glucose par molécule sont présents dans les OPG de la souche *mdoD217::cml*. De plus, la présence du plasmide pNF599 qui permet de compléter la mutation *mdoD218::cml* ne permet pas de compléter la mutation *mdoD217::cml*. Néanmoins, le profil de la colonne d'échange d'anions des OPG de la souche NFB1523 semble intermédiaire entre celui des OPG de la souche sauvage et de la souche *mdoD217::cml*. Cette dominance pourrait s'expliquer par une compétition entre les protéines MdoD et MdoD217 pour le complexe MdoG-MdoH qui entraînerait la formation d'une structure des OPG intermédiaire entre celle des OPG de la souche sauvage et celle de la souche *mdoD217::cml*. La protéine MdoD pourrait agir en oligomères. Dans une souche *mdoD217::cml*, des oligomères inactifs de protéines sauvages et mutantes pourrait se former et expliquer la dominance de la mutation.

La protéine MdoD semble homogénéiser la taille des squelettes glucosidiques dans le

but de maintenir une certaine qualité structurale des OPG lors de leur biosynthèse. L'intervention de la protéine MdoD pourrait s'effectuer en coopération avec le complexe MdoGH ou sur des OPG libres dans le périplasme. La protéine pourrait avoir soit un rôle de contrôleur de qualité permettant la libération d'OPG de taille relativement homogène et agirait donc en coopération avec le complexe MdoGH lors de la synthèse des OPG, ou soit réarranger les liaisons ou la longueur des squelettes glucosidiques afin d'homogénéiser la taille des OPG. Cette action de réarrangement pourrait s'effectuer de manière concomitante ou postérieure à la biosynthèse des OPG par le complexe MdoGH.

La co-cristallisation de la protéine MdoD avec différents OPG permettrait d'appréhender la localisation des domaines actifs de cette protéine.

2) Éléments de régulation du gène *mdoD*.

Les tests de complémentation effectués à partir des plasmides pNF570 et pNF1015 ont montré la nécessité d'une région située entre les nucléotides 1093 et 1626 pb en amont du codon initiateur du gène *mdoD* pour l'expression de ce gène. Les analyses des expressions des deux fusions traductionnelles *mdoD-lacZ* correspondant respectivement aux plasmides pNF574 et pNF599 ont révélé deux comportements distincts dans un contexte *rpoS*. L'expression de la petite fusion *mdoD-lacZ* est totalement dépendante du facteur σ^S . Par contre, l'expression de la grande fusion *mdoD-lacZ* n'est que partiellement affectée par l'inactivation du gène *rpoS* avec une dépendance équivalente vis-à-vis des facteurs σ^{70} et σ^S durant la transition vers la phase stationnaire et une dépendance majoritaire en faveur du facteur σ^{70} (70-80%) lors de la phase stationnaire. De plus, l'expression de la grande fusion *mdoD-lacZ* est significativement supérieure à celle de la petite fusion *mdoD-lacZ* au cours de la croissance. Des rapports de 4,5 durant la phase exponentielle et de 2,4 en phase stationnaire et un pic d'induction plus aigu en phase stationnaire précoce sont observés avec la grande fusion *mdoD-lacZ*.

Le fragment *KpnI* contiendrait apparemment tous les éléments nécessaires pour une transcription dépendante du facteur σ^S . Le fragment *BpmI-KpnI* contiendrait des éléments supplémentaires qui provoquerait une dépendance de la transcription du gène *mdoD* vis-à-vis des facteurs σ^{70} et σ^S . L'expression du gène *mdoD* apparaît être régulée par une composante minoritaire dépendante du facteur σ^S et par une composante majoritaire dépendante du facteur σ^{70} associée probablement à un facteur de régulation non identifié.

Ces études de régulation et de complémentation suggèrent que l'intervention du

produit du gène *mdoD* dans la biosynthèse des OPG s'effectue lors de la phase exponentielle et lors de la transition vers la phase stationnaire, au même moment où les protéines MdoG et MdoH sont actives. La transcription du gène *mdoD* initié par le facteur σ^{70} apparaît être en majorité responsable de l'action de la protéine MdoD lors de la biosynthèse des OPG. La régulation de la transcription par le facteur σ^S et l'accumulation de la protéine MdoD en phase stationnaire [Link et coll., 1997a] ne semble intervenir que très minoritairement dans la biosynthèse des OPG dans les conditions expérimentales testées. D'autres conditions environnementales (relations hôtes-bactéries) pourraient engendrer une plus grande dépendance de l'expression du gène *mdoD* vis-à-vis du facteur σ^S .

La nécessité d'une région amont de 1626 pb pour la complémentation de la mutation *mdoD218::cml* a suggéré l'importance de la conformation de l'ADN dans l'expression du gène *mdoD*. Les activités des fusions mesurées dans un contexte *himA* ou *hns* n'ont pas révélé de différences significatives par rapport à un contexte sauvage. L'expression du gène *mdoD* ne semble pas être régulée par des variations de la conformation de l'ADN générées par les facteurs IHF et H-NS. Le surenroulement pourrait avoir une influence sur l'expression du gène *mdoD*. Des mesures de l'activité des fusions dans des souches possédant des mutations dans les gènes régulant le surenroulement de l'ADN (*girA*, *topA*) couplées à l'utilisation de composés chimiques modifiant ce surenroulement de l'ADN permettrait d'appréhender le rôle de la conformation de l'ADN dans l'expression du gène *mdoD*.

Une séquence proche intrinsèquement dans l'espace pourrait être reconnue par un facteur régulateur et permettre l'initiation de la transcription du gène *mdoD* par le facteur σ^{70} . Si l'importance de la situation spatiale de cette séquence régulatrice est considérée, les séquences en amont des sites *BpmI* peuvent être exclues et la séquence régulatrice serait localisée entre les nucléotides 1562 et 1093 en amont du codon initiateur du gène *mdoD*.

La génération de délétions permettra une détermination précise de la séquence de régulation située en amont du promoteur. L'extension d'amorce en phase exponentielle et en phase stationnaire permettrait de déterminer s'il existe deux sites distincts de l'initiation de la transcription. La mutagenèse par transposon sur des cultures de souches portant la grande fusion *mdoD-lacZ* pourrait permettre d'identifier une protéine régulatrice du gène *mdoD* par la recherche de clones rouges sur un milieu contenant du tétrazolum. Le produit du gène régulant le gène *mdoD* pourrait être commun à l'expression des autres gènes *mdo*.

IV) Apport de la phylogénie dans la compréhension de la biosynthèse des OPG.

Trois organisations des gènes de type *mdoGH* sont retrouvées dans les différents génomes séquencés ou en cours de séquençage (voir introduction). Le point commun entre ces trois organisations est la présence du gène *mdoH* qui forme la base permettant la biosynthèse des OPG. La protéine MdoH semble permettre la biosynthèse d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 qui sera modifiée par la ou les protéines MdoG et MdoD selon les espèces.

La présence unique soit de la protéine OpgG chez *P. aeruginosa* soit de la protéine OpgD chez *X. fastidiosa* et la biosynthèse d'OPG semblables chez ces deux espèces suggère une fonction très proche entre ces deux protéines au niveau de la ramification de la chaîne linéaire synthétisée par la protéine OpgH. L'implication de la protéine MdoD dans le maintien de la longueur et du taux de branchement du squelette glucosidique renforce l'hypothèse de l'implication de la protéine OpgG dans la formation des branches pour les OPG linéaires. De même, chez *X. citri*, les gènes *opgH* et *opgD* permettent la biosynthèse d'OPG cycliques. Selon l'espèce, les gènes *opgD* ou *opgG* pourraient être impliqués dans la cyclisation des OPG.

Si la conservation des séquences entre les protéines OpgG et OpgD suggère une fonction proche, il n'en reste pas moins que ces deux protéines semblent intervenir de manière distincte dans la biosynthèse des OPG. Lorsque le gène *opgG* est présent chez une espèce, il est indispensable à la biosynthèse des OPG. Par contre, lorsque le gène *opgD*, dont le gène homologue chez *E. coli* n'est pas indispensable à la biosynthèse des OPG, est présent et que le gène de type *opgG* est absent, la biosynthèse des OPG semblerait être strictement dépendante du gène *opgH* lorsque le (*X. fastidiosa*) puisque le gène *opgH* de *X. fastidiosa* semble être capable de synthétiser des OPG sans la protéine MdoD ou MdoG lors de d'une complémentation hétérologue chez *E. coli*. Ces différences suggèrent une coopération forte entre les protéines OpgG et OpgH qui ne semble pas avoir lieu avec la protéine OpgD sans pour autant exclure des interactions entre ces deux protéines.

La grande similitude de séquence entre les protéines OpgG et OpgD retrouvée à travers les espèces suggère l'existence d'un gène ancestral. Actuellement, il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit de la duplication du gène *opgG* qui a donné le gène *opgD* ou inversement.

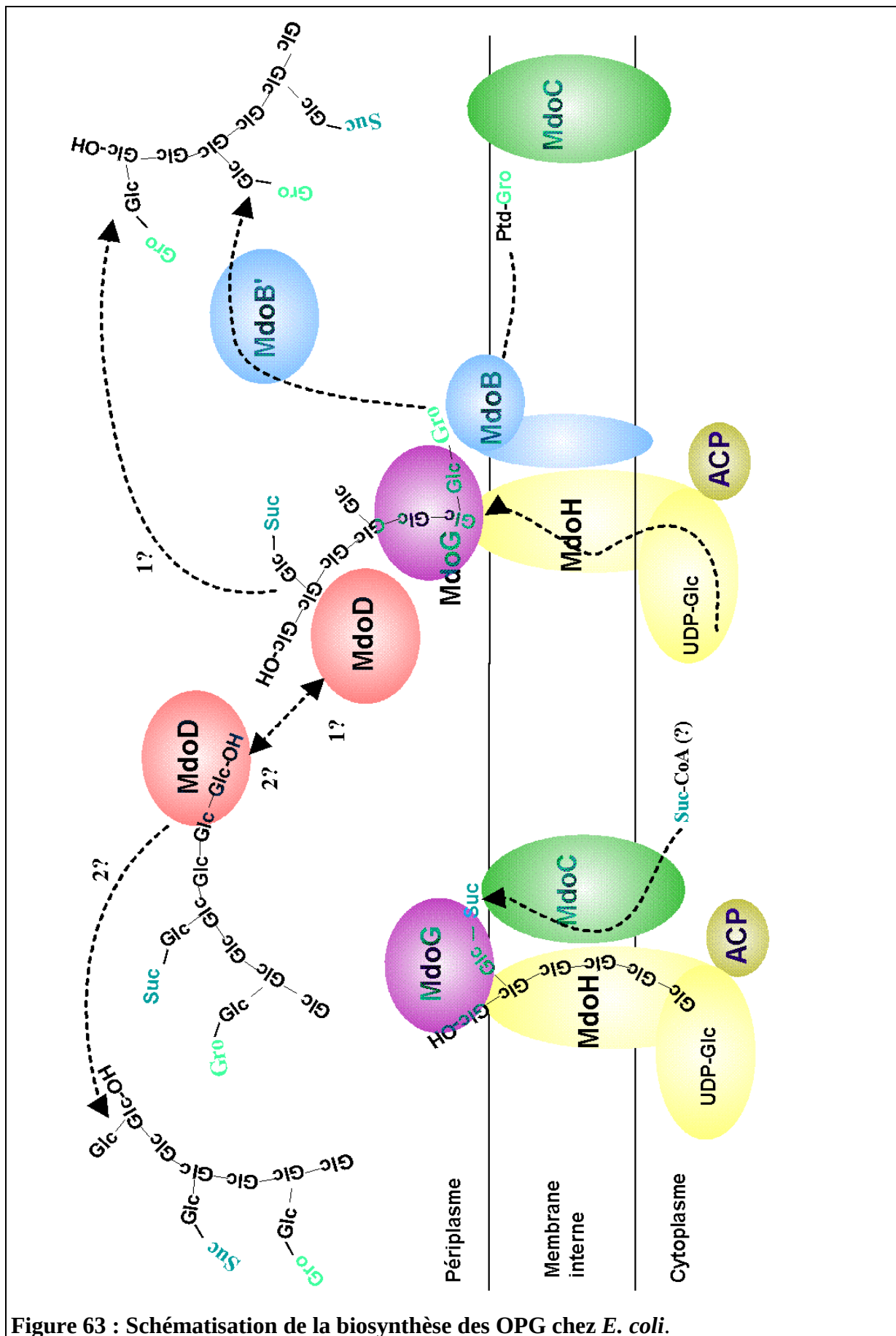


Figure 63 : Schématisation de la biosynthèse des OPG chez *E. coli*.

Dans le cas de la duplication du gène *opgD*, la formation d'un opéron *opgGH* aurait pu apporter une meilleure coordination de l'expression des gènes de biosynthèse et donner un avantage pour le développement des bactéries. L'absence du gène *opgD* serait le fait d'une réorganisation ultérieure du génome chez une espèce donnée (*P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*). Dans les cas des entérobactéries, le gène *opgD* serait la trace du gène ancestral.

En présence d'un allèle *opgG*, l'importance du gène *opgD* dans la biosynthèse des OPG et pour leur fonction sur le génome reste indéterminée.

Des complémentations hétérologues chez *E. coli* avec des gènes *opgG* et *opgD* pourraient apporter des éléments de réponses quant à leur fonction respective dans la génération des branches ou dans la cyclisation.

B) Biosynthèse des OPG chez *E. coli*.

1) Mécanismes de biosynthèse des OPG.

La nécessité des protéines MdoG et MdoH pour la synthèse du squelette glucosidique et une substitution rapide des OPG suggère la formation d'un complexe protéique autour de la protéine MdoH. Tout d'abord, l'UDP-glucose se fixerait sur le domaine GT2 en coopération avec l'ion Mg^{2+} et une amorce de nature inconnue se fixerait sur le domaine B de la partie C2 cytoplasmique de la protéine MdoH (figure 63). Une réaction de transfert permettrait la création d'une liaison de type β -1,2 entre l'amorce et le carbone 1 du résidu de glucose en libérant l'UDP. L'allongement de la chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 s'effectuerait par l'extrémité non réductrice. Ce résidu de glucose nouvellement fixé serait déplacer dans le domaine B et servirait d'accepteur pour l'ajout d'un nouveau résidu de glucose à partir de l'UDP-glucose. Les segments transmembranaires de la protéine permettraient de diriger la chaîne naissante vers la face périplasmique.

La protéine MdoG pourrait interagir avec cette chaîne naissante, la tirer pour assister la protéine MdoH dans la translocation des OPG vers le périplasme et former des liaisons β -1,6. Cette assistance dans la translocation engendrerait une dynamique dans la biosynthèse des OPG et pourrait axer celle-ci vers un mécanisme processif. A l'action de ces deux protéines indispensables s'ajoute l'activité de la protéine MdoD qui pourrait réarranger le squelette glucosidique sur des molécules solubles et/ou sur le squelette glucosidique en cours de synthèse ou effectuer un rôle de contrôle de qualité pour libérer des OPG relativement homogènes ou encore contribuer à la processivité de la biosynthèse des OPG.

Une partie de la substitution des OPG doit probablement s'effectuer simultanément à

la sécrétion des OPG puisqu'en 10 min 65% des résidus de succinate sont associés aux OPG. Ainsi, la protéine MdoC doit être probablement très proche du complexe MdoGH et permettrait la substitution des OPG lors de leur translocation dans le périplasme à raison d'un résidu de succinate par molécule en moyenne. La substitution des OPG par les résidus de phosphoglycérol s'effectue probablement en deux temps du fait de la présence d'une activité phosphoglycérol-transférase I membranaire et d'une activité phosphoglycérol-transférase II périplasmique. L'activité phosphoglycérol-transférase I permettrait une substitution primaire des OPG à partir des résidus de phosphoglycérol des phosphatidylglycérols. Cette activité localisée au niveau de la membrane pourrait s'effectuer au cours de la translocation des OPG ou sur des OPG proches de la membrane. L'activité phosphoglycérol-transférase II utilise les résidus de phosphoglycérol provenant de molécules d'OPG déjà substituées. Cette activité périplasmique soluble pourrait s'effectuer ultérieurement à la biosynthèse du squelette glucosidique sur des molécules solubles. Les résidus de phosphoglycérol pourraient provenir de molécules d'OPG solubles ou de molécules d'OPG en cours de translocation.

Les différences de propriétés d'une protéine due à sa localisation ont déjà été observées avec d'autres protéines comme dans le cas de la NAD^+ glycosyltransférase de la rate de veau. La comparaison des propriétés physico-chimiques de la forme membranaire et soluble de cette protéine ont permis de révéler des changements dans les paramètres cinétiques tels que la stabilité et les propriétés de fixation du substrat. Ces variations, appelées changements allotropiques [Racker, 1967], sont expliquées en partie par les interactions des phospholipides avec la forme membranaire de la protéine. La forme soluble n'est pas inhibée par l'AMPC alors que la forme membranaire y est sensible [Travo et coll., 1979]. L'influence des phospholipides sur l'activité des protéines a aussi été mise en évidence sur la protéine DegP (HtrA). L'association des phosphoglycérols avec la protéine DegP a entraîné une augmentation de l'activité protéolytique de cette protéine entre 37°C et 45°C et une diminution entre les températures 50°C et 55°C [Skorko-Glonek et coll., 1997]. L'association des phospholipides avec la protéine MdoB membranaire pourrait expliquer ses propriétés distinctes avec la protéine MdoB' périplasmique.

II) Eléments de régulation des gènes *mdo* chez *E. coli*.

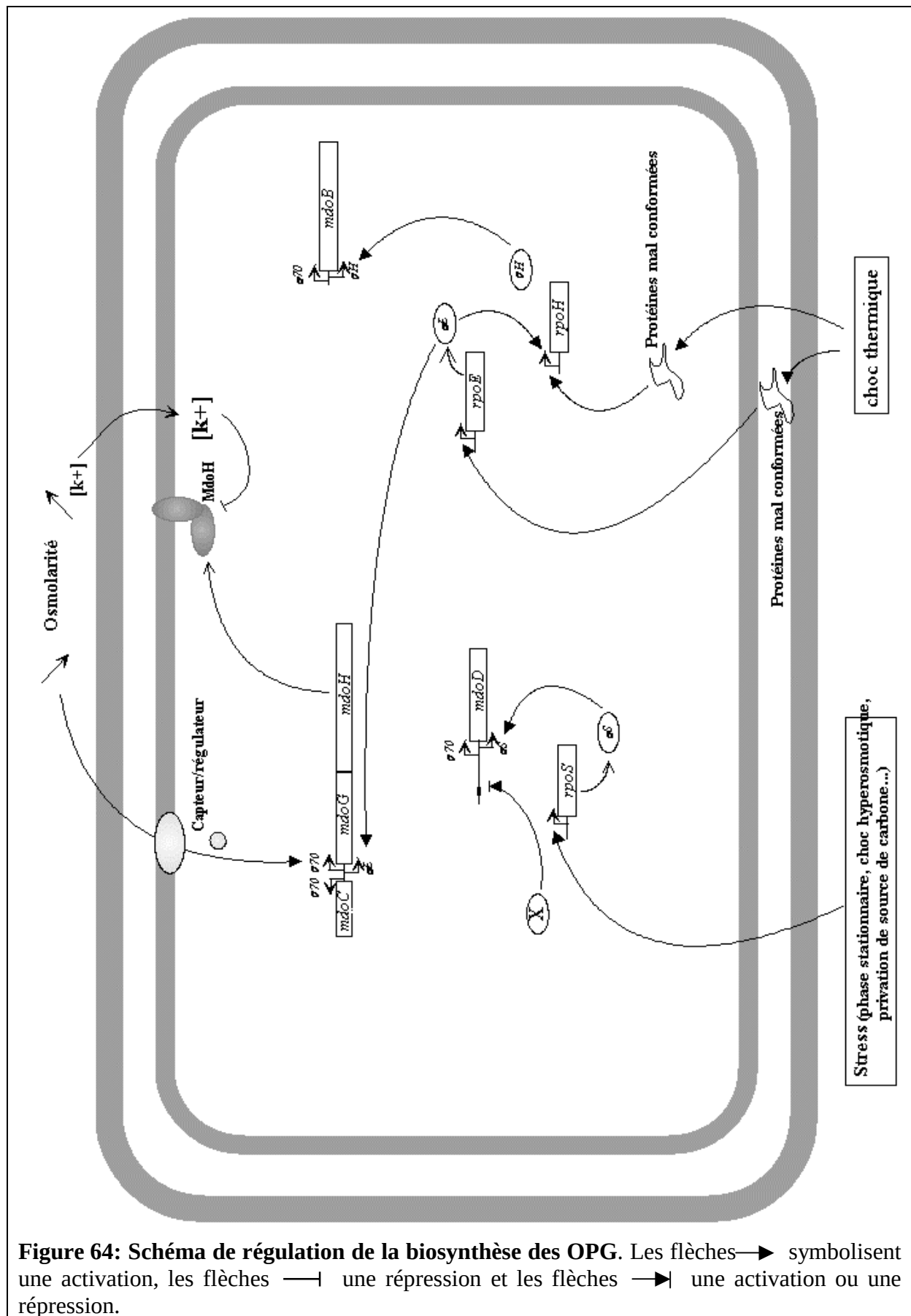
L'osmorégulation de la biosynthèse des glucanes périplasmiques trouvée chez plusieurs Protéobactéries a permis de les réunir sous la dénomination d'OPG (Osmoregulated Periplasmic Glucans). Des études ont montré l'existence d'une régulation osmotique de

l'opéron *mdoGH* au niveau transcriptionnelle [Lacroix et coll., 1991] avec une augmentation du taux ARNm à basse osmolarité. La nature des facteurs permettant cette osmorégulation reste inconnue. A cette régulation génétique s'ajoute une régulation au niveau enzymatique. Cette dernière s'effectue par l'intermédiaire de la force ionique cytoplasmique qui inhibe l'activité la protéine MdoH [Rumley et coll., 1992] lors de l'augmentation de l'osmolarité. L'ion K^+ paraît être un candidat pour exercer cette inhibition au niveau enzymatique (figure 64).

L'analyse du génome d'*E. coli* et les études sur les facteurs σ alternatifs ont permis d'obtenir de nouveaux éléments impliqués dans l'expression des gènes *mdo*. Ainsi, en plus du promoteur reconnu par le facteur σ^{70} situé devant l'opéron *mdoGH*, un promoteur dépendant du facteur alternatif σ^E a été mis en évidence et permet la transcription de l'opéron *mdoGH* [Dartigalongue et coll., 2001a]. La prédiction des promoteurs sur le génome d'*E. coli* révèle une séquence promotrice du gène *mdoB* reconnue par le facteur σ^H en plus de celle reconnue par le facteur σ^{70} (http://www.cifn.uman.mx/Computational_Genomics/regulonDB). Les facteurs σ^H et σ^E sont tous deux respectivement impliqués dans la réponse cellulaire lors de la présence de protéines mal conformées au niveau de l'enveloppe et du cytoplasme. Les OPG pourraient intervenir lors de dommages au niveau de l'enveloppe pour minimiser l'effet du stress en interagissant avec les protéines ou les phospholipides de l'enveloppe.

La présence du facteur σ^H dans le régulon σ^E permettrait de coordonner l'expression des gènes *mdoGH* impliqués dans la biosynthèse du squelette glucosidique avec celle du gène *mdoB* impliqué dans la substitution des OPG par des résidus de phosphoglycérol. L'implication du facteur σ^S dans la régulation du gène *mdoD* ajoute un degré de complexité dans la régulation de la biosynthèse des OPG.

L'expression du gène *mdoD* dépend à la fois des facteurs σ^S et σ^{70} auquel s'ajoute probablement un facteur régulateur. Cela permettrait la coordination de l'expression du gène *mdoD* avec l'expression de l'opéron *mdoGH*. La composante minoritaire de la transcription du gène *mdoD* par le facteur σ^S par rapport à celle du facteur σ^{70} , dans les conditions expérimentées lors de ce travail, et le rôle ambigu de la protéine MdoD dans le maintien de la structure du squelette glucosidique rend difficile l'interprétation du rôle du facteur σ^S dans la régulation de la synthèse des OPG.



L'implication de différents facteurs sigma (σ^E , σ^H et σ^S) alternatifs dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des OPG et l'interconnexion de leurs régulons suggère que les OPG soient intégrés dans un système global de régulation et contribueraient à maintenir les fonctionnalités de l'enveloppe soit en interagissant avec les protéines ou avec les phospholipides de l'enveloppe et de ce fait permettrait la croissance des bactéries dans diverses conditions.

Matériels et méthodes

A) Souches et milieux de culture.

l) Géotypes des souches et plasmides utilisés.

Les souches utilisées sont toutes issues de la souche *E. coli* K-12, et sont répertoriées dans la table 1 pour les souches sans plasmides et dans la table 2 pour celles avec plasmides. Les plasmides utilisés sont répertoriés dans la table 3.

Table 1 : Liste des souches d'*E. coli* K-12.

Souches	Génotype	Sources
LE392	F ⁻ , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hsdR514</i> , <i>supF58</i> , <i>supE44</i> , <i>fhuA</i> , λ^- .	[Lightfoot et coll., 1991]
JM83	$\Delta(lac-pro)$, <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ($\Phi 80 \Delta lacZ-M15$).	[Vieira et coll., 1982]
JC7623	<i>argE3</i> , <i>hisG4</i> , <i>leuB6</i> , $\Delta(gpt-proA)62$, <i>thr-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2 lacY1</i> , <i>mtl-1</i> , <i>xyl-1</i> , <i>kdgK51</i> , <i>tsx33</i> , <i>recB21</i> , <i>recC22</i> , <i>sbcB15</i> , <i>supE44</i> , <i>rpsL31</i> , <i>rac</i> .	[Horii et coll., 1973]
BB2636	HfrC, <i>glpD3</i> , <i>glpK4</i> , <i>glpR2</i> , <i>plsB26</i> , <i>phoA</i> , <i>fhuA22</i> , <i>rel-1</i> .	[Bell, 1974]
DF214	<i>His</i> , <i>pgi::Mu</i> , $\Delta(zwf-edd)1$, <i>eda-1</i> , <i>rpsL</i> .	[Vinopal et coll., 1975]
XL1 blue	F', <i>thi-1</i> , <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , $\Phi 180 lacZ \Delta-M15$.	[CGSC]
MC4100	F ⁻ , <i>thiA</i> , $\Delta(lac)U169$, <i>ara139</i> , Δbet , <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flhD5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i> .	[Casadaban et coll., 1979]
SM10 λ pir	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lacY</i> , <i>recA::RP4-2-Tet::Mu-Kanr</i> , <i>tonA</i> , <i>supE</i> , <i>rpoB</i> , λ pir.	[De lorenzo et coll., 1994]
CC118	<i>AraD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74$, $\Delta phoA20$, <i>galE</i> <i>,galK</i> , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>argE_{am}</i> , <i>rpoB</i> , <i>thi</i> .	[Manoil et coll., 1997]
CC118 λ pir	<i>AraD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74$, $\Delta phoA20$, <i>galE</i> <i>,galK</i> , <i>recA1</i> , <i>rpsE</i> , <i>argE_{am}</i> , <i>rpoB</i> , <i>thi</i> λ pir.	[De lorenzo et coll., 1994]
CC245	<i>supF</i> , <i>supE</i> , <i>hsdR</i> , <i>galK</i> , <i>trpR</i> , <i>metB</i> , <i>lacY</i> , <i>tonA</i> <i>dam::kan</i>	[Manoil et coll., 1997]

RH90	MC4100, <i>rpoS359::Tn10</i> .	[Lange et coll., 1994]
678	F ⁻ , <i>proC</i> , <i>trp</i> , <i>tsx</i> , <i>xyl</i> , <i>mtl</i> , <i>ΔphoAB</i> , <i>rpsL</i> .	[Portalier R.]
AB1133	<i>SupE44</i> , <i>Thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>Δ(gpt-proA)62</i> , <i>hisG4</i> , <i>argE3</i> , <i>thi1</i> , <i>ara14</i> , <i>lacY</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl1</i> , <i>rpsL31</i> .	[CGSC]
PT227	AB1133, <i>mdoB::Tn10</i>	[Jackson et coll., 1984]
NFB216	JM83; <i>mdoH200::Tn10</i> , <i>pyrC46</i> .	[Lacroix et coll., 1989a]
NFB362	MC4100; <i>argE3</i> , <i>rpoB</i> .	[Aufrère et coll., 1986]
NFB702	JM83; <i>mdoG202::neo</i> , <i>pyrC46</i> .	[Loubens et coll., 1993]
NFB732	JM83; <i>mdoB214::Tn10</i> .	[Lanfroy, 1997]
NFB734	DF214; <i>mdoB214::Tn10</i> .	[Lacroix, 1989b]
NFB739	BB2636, <i>mdoG202::néo</i> .	[Lacroix, 1989b]
NFB1802	DF214, <i>rpoS359::Tn10</i>	Collection du laboratoire
NFB1814	678, <i>mdoB::Tn10</i> .	[Lanfroy, 1997]
NFB1920	JM83; <i>mdoD217::cml</i> .	Cette étude
NFB1925	DF214; <i>mdoD217::cml</i> .	Cette étude
NFB1926	NFB764; <i>mdoD217::cml</i> .	Cette étude
NFB1927	BB2636; <i>mdoD217::cml</i> .	Cette étude
NFB1928	RH90, <i>recA::cat-aad</i> .	Cette étude
NFB1949	MC4100, <i>recA::cat-aad</i> , <i>ΔhimA82::Tn10</i>	Collection du laboratoire
NFB1950	MC4100, <i>recA::cat-aad</i> , <i>hns205::Tn10</i>	Collection du laboratoire
NFB1967	DF214, <i>mdoD218::cml</i>	Cette étude
NFB1987	DF214, <i>b1423::kan</i>	Cette étude
NFB1990	BB2636, <i>mdoH200::Tn10</i> , <i>recA::cat-aadA</i>	Cette étude

Table 2 : liste des souches *E. coli* contenant un plasmide.

Souche	Génotype	Sources
NFB1470	NFB362, pNF574	Cette étude
NFB1471	NFB1928, pNF574	Cette étude
NFB1473	NFB1925, pNF573	Cette étude
NFB1481	NFB1949, pNF574	Cette étude
NFB1482	NFB1950, pNF574	Cette étude
NFB1484	NFB216, pNF581	Cette étude
NFB1483	NFB1925, pNF565	Cette étude

NFB1486	DF214, pNF571	Cette étude
NFB1487	DF214, pNF565	Cette étude
NFB1513	CC118λpir, pNFB1012	Cette étude
NFB1521	NFB1987, pNF592	Cette étude
NFB1523	NFB1925, pNF599	Cette étude
NFB1524	NFB1987, pNF599	Cette étude
NFB1554	NFB1967, pNF1015	Cette étude
NFB1556	NFB362, pNF1016	Cette étude
NFB1557	NFB1928, pNF1016	Cette étude
NFB1560	NFB1949, pNF1016	Cette étude
NFB1561	NFB1950, pNF1016	Cette étude
NFB1563	CC118λpir, pNF1020	Cette étude
NFB1564	NFB1925, pNF597	Cette étude
NFB1565	NFB1967, pNF587	Cette étude
NFB1566	NFB1967, pNF597	Cette étude
NFB1567	NFB1967, pNF599	Cette étude
NFB2132	678, pNF604	[Lanfroy, 1997]

Table 3 : Liste des plasmides.

Plasmides	Caractéristiques	Sources
pUC18	Amp ^r	[Yannisch-Perron et coll., 1985]
pUC19	Amp ^r	[Yannisch-Perron et coll., 1985]
pYZ4	Kan ^r	[Broome-Smith et coll., 1990]
PBluescript SK ⁻	Amp ^r , contient une origine F1.	[Stratagène]
pMN482	Amp ^r , 'lacZ	[Minton, 1984]
pBR328	Amp ^r , Cml ^r , Tet ^r .	[Soberon et coll., 1980]
pNF244	Amp ^r , <i>mdoGH</i> dans pUC8	[Lacroix, 1989b]
pNF309	Kan ^r , <i>mdoH</i> dans pYZ4	[Debarbieux, 1995]
pNF424	Amp ^r , <i>mdoG215</i> dans pUC8	[Debarbieux, 1995]
pNF446	Kan ^r , <i>mdoH</i> dans pYZ4	[Kosciarz, 1995]

pNF449	Amp ^r , <i>mdoGH</i> dans pUC19	Collection du laboratoire
pNF483	Kan ^r , <i>mdoHQ561W562</i> dans pYZ4	[Kosciarz, 1995]
pNF484	Kan ^r , <i>mdoHQ561</i> dans pZY4	[Kosciarz, 1995]
pNF565	Amp ^r , <i>mdoD</i> dans pUC18	Cette étude
pNF570	Amp ^r , <i>mdoD</i> dans pUC18	Cette étude
pNF571	Amp ^r , <i>mdoD217::cml</i> dans pUC18	Cette étude
pNF572	Amp ^r , <i>mdoD</i> dans pUC19	Cette étude
pNF573	Kan ^r , <i>mdoD</i> dans pYZ4	Cette étude
pNF574	Amp ^r , petite fusion <i>mdoD-lacZ</i> dans pNM482	Cette étude
pNF581	Amp ^r , <i>mdoGH</i> dans pUC19 dépourvue de site <i>Bam</i> HI	Cette étude
pNF483	Kan ^r , Epitope <i>Hind</i> III en place de Q561 et W562.	[Kosciarz, 1995]
pNF484	Kan ^r , Epitope <i>Hind</i> III en place de Q561.	[Kosciarz, 1995]
pNF585	Amp ^r , <i>mdoD218 ::cml</i>	Cette étude
pNF586	Amp ^r , fragment <i>Sac</i> II- <i>Sma</i> I de <i>mdoGH</i> dans pbluescript M13- (SK-)	Cette étude
PNF587	Kan ^r , <i>mdoD</i> sous contrôle de <i>placUV5</i>	Cette étude
pNF591	Amp ^r , petite fusion <i>mdoD-lacZ</i> dans pUC18 <i>Not</i> I.	Cette étude
pNF592	Amp ^r , ORF b1423 dans pUC18	Cette étude
pNF593	Amp ^r , ORF b1423::néo dans pUC18	Cette étude
pNF596	Amp ^r , neo 'b1423 ::néo <i>mdoD</i> dans pUC18	Cette étude
pNF597	Amp ^r , 'b1423 <i>mdoD</i> dans pUC18	Cette étude
pNF599	Amp ^r , b1423 <i>mdoD</i> dans pUC18	Cette étude
pNF604	Kan ^r , <i>mdoB</i> ⁺ dans pYZ4	[Lanfroy, 1997]
pNF1012	Amp ^r , petite fusion <i>mdoD-lacZ</i> dans pUTmini-Tn5kan	[De lorenzo et coll., 1994]
pNF1013	Kan ^r , fragment <i>Sph</i> I- <i>Xba</i> I dans pYZ4	Cette étude
pNF1014	Amp ^r , ORF b1423 délété de son promoteur (Δ <i>Bpm</i> I)	Cette étude
pNF1015	Amp ^r , b1423 Δ <i>Bpm</i> I, <i>mdoD</i> .	Cette étude
pNF1016	Amp ^r , grande fusion <i>mdoD-lacZ</i> dans	Cette étude

	pNM482	
pNF1019	Amp ^r , grande fusion <i>mdoD-lacZ</i> dans pUC18 <i>NotI</i>	Cette étude
pNF1020	Amp ^r , grande fusion dans pUTminTn5Kan	Cette étude

II) Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries.

Les souches sont cultivées à 37°C ou 30°C sous agitation (150 rpm).

La croissance des bactéries est suivie par mesure de la turbidité à 620nm.

La composition des différents milieux est décrite ci-dessous :

Le Milieu LB ou Luria–Bertani [Miller, 1992]. L’omission du NaCl permet d’obtenir un milieu d’osmolarité réduite à 150 mosM.

Le Milieu 2YT, utilisé pour la production de phages filamenteux de type M13, se compose d’extrait de levure à 10 g/l, de bactotryptone à 16 g/l et de NaCl à 10 g/l.

Le Milieu minimum 63 [Miller, 1992] est complémenté par les métabolites nécessaires à la croissance des différentes souches : acides aminés et bases azotées à 40 mg/ml, thiamine à 2 mg/ml et sources de carbone à 0,2 %. L’osmolarité du milieu est d’environ 70 mosM et peut être augmentée par l’ajout de NaCl.

Le milieu LOS, de basse osmolarité (70 mosM) se compose de K₂HPO₄ à 1 mM ; (NH₄)₂SO₄ à 1,5 mM ; MgCl₂ à 0,08 mM ; FeSO₄ à 0,5 g/l ; d’hydrolysât de caséine à 4 g/l et de thiamine à 2mg/ml. Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris (1M) et complémenté si nécessaire. L’osmolarité de ce milieu est de 70 mosM et peut être augmentée par l’ajout de NaCl.

Ces milieux peuvent être solidifiés par l'ajout d'Agar à 15 g/l. Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline, 50 µg/ml ; kanamycine, 50 µg/ml ; chloramphénicol, 15 µg/ml. l'IPTG (Isopropyl-β-D thio-galactopyranoside), le X-gal (5bromo, 4chloro, 3indolyl, β-D galactopyranoside) et le X-phosphate (5bromo, 4chloro, 3indolyl, β-D galactopyranoside) sont utilisés à la concentration de 1 mM.

B) Techniques Génétiques.

I) Transduction.

La transduction utilisant le phage P1vir est réalisée d’après Miller [Miller, 1992].

II) Conjugaison.

Les plasmides dérivés de pUTminiTn5-kan^r contiennent une origine de répllication *ori* RK6 et ne peuvent donc être maintenus que dans une souche permissive qui synthétise la protéine *pir* apportée par un phage λ *pir* lysogène. Le vecteur pUT-miniTn5-kan possède aussi une origine de transfert *ori* T-RP4 permettant la mobilisation de ce vecteur lorsque celui-ci est contenu dans une souche possédant les gènes de mobilisation de type RP4 [De Lorenzo et coll., 1994]. Les conjugaisons sont réalisées entre la souche donatrice SM10 λ *pir* portant les différents plasmides dérivés de pUT mini Mu Tn5kan^r et la souche réceptrice NF362.

III) Transformation.

Les souches d'*E. coli* sont rendues compétentes par la méthode au chlorure de rubidium [Hanahan, 1983].

IV) Recombinaison sur chromosome.

Le plasmide portant la construction à insérer sur le chromosome est linéarisé puis introduit par transformation dans la souche JC 7623 (*recB*, *recC* *sb*CB). La sélection s'est effectuée grâce à la résistance insérée dans le gène. La perte de la résistance du plasmide est ensuite vérifiée.

V) Mutagenèse par insertion aléatoire de transposon.

Le transposon Tn*LacZ*/in ou Tn*phoA*/in est porté par un phage λ (λ Δ att Pam *ci*857) permettant une introduction du transposon efficace et simple dans les cellules bactériennes. Ces phages sont incapables d'entrer dans un cycle lysogène et ne peuvent se répliquer dans une souche non permissive. Par conséquent, les bactéries portant le transposon sont facilement sélectionnées sur un milieu riche contenant du chloramphénicol (résistance apportée par le transposon) et de l'ampicilline (résistance apportée par le plasmide pNF581). Les clones obtenus sont ensuite criblés pour leur résistance à la kanamycine. Dans les clones sensibles à la kanamycine, l'IS50 gauche seule est insérée sur le plasmide ou sur le chromosome ; tandis que les clones résistants possèdent la totalité du transposon.

1) Production des phages λ Tn*lacZ*/in et λ Tn*phoA*/in.

Les phages λ Tn*lacZ*/in et λ Tn*phoA*/in sont multipliés dans une souche dam⁻ (CC245). 5 ml de culture (12h) sont concentrés deux fois dans une solution de MgSO₄ 10⁻²M. 0,1 ml de cellules et 0,1 ml de phages sont mélangés et incubés 20 min à 37°C sans agitation pour

permettre l'adsorption des phages sur les bactéries. 1 ml de LB et 2,5 ml de Rtop sont ajoutés aux cellules infectées et étalés sur des boîtes fraîches de Rmed et incubées à 42°C durant la nuit pour permettre la production de phages. Le lendemain, les phages sont récupérés en grattant la surcouche à laquelle 2 ml LB ont été ajoutés. Quelques gouttes de chloroforme sont ajoutées et la surcouche qui est récupérée, vortexée et centrifugée à 4°C à 1000g durant 20 min. Le surnageant contenant les particules phagiques est récupéré.

2) Insertions aléatoires de l'IS50 gauche.

Les phages sont utilisés pour infecter une souche *recA*⁻ portant le plasmide pNF581 (NFB1484). Le protocole utilisé est celui explicité par Manoïl et coll. [Manoïl et coll., 1997]. Une multiplicité d'infection de 0,3 est utilisée pour les deux phages. Une culture de souche NFB1484 est dispatchée en petites cultures de 0,2 ml qui sont infectées par l'un des phages λ . Ceci permet d'obtenir des cultures indépendantes. Les bactéries sont incubées 10 min sans agitation à 30°C pour permettre l'adsorption des phages, puis 0,8 ml de LB est ajouté et les bactéries sont incubées à 30°C durant 2 h sous agitation (150 rpm) pour l'infection avec le phage λ Tn*lacZ*/*in* et 8 h pour l'infection le phage λ Tn*phoA*/*in*.

Les bactéries de chaque culture indépendante sont ensuite étalées sur un LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol (100 μ l/ml). L'ensemble des clones de chaque boîte sont récupérés, en ajoutant 1 ml de LB, pour en extraire les plasmides qui sont utilisés pour transformer des bactéries CC118 (*recA*). Ces bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB sans NaCl contenant du Saccharose (5%) et du X-gal ou du X-P selon le phage utilisé. Un clone bleu par petite culture indépendante de 0,2 ml est récupéré et testé pour sa sensibilité à la kanamycine. Les transformants kanamycine sensibles sont récupérés : Ils contiennent un plasmide possédant une insertion aléatoire de l'IS50 gauche du transposon.

3) Production d'ADN simple brin.

Le plasmide pNF586 contenant le fragment *SacII-SmaI* dans le vecteur pbluescript SK⁻ est introduit dans la souche CJ236. Cette souche porte les mutations *dut* et *ung*. La mutation *dut* a pour conséquence une déficience de la dUTPase, ce qui provoque une concentration élevée de dUTP qui entre en compétition avec le dTTP. La mutation *ung* provoque une déficience en uracil-N-glycosylase qui est chargée d'éliminer les bases uraciles incorporées dans l'ADN. Cette double mutation contraint donc l'incorporation de bases uraciles en place des bases thymine dans l'ADN.

Le phage auxiliaire R408 permet la production d'ADN simple brin à partir du vecteur

pbluescript SK⁻. 20 ml de culture à DO_{620nm} 0,2 de la souche NFB1520 (CJ236 pNF586) sont infectés par le phage auxiliaire à une multiplicité de 10 et incubés durant la nuit à 37°C. Les cellules sont alors centrifugées 5 min à 8000g et le surnageant est récolté puis centrifugé à nouveau pour éliminer toutes les bactéries. Le surnageant est alors aliquoté en volume de 1,3 ml auxquels on ajoute 200 µl de PEG 6000 NaCl 2,5 M. Après 15 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés 5 min au maximum pour éliminer le surnageant. Une seconde centrifugation est effectuée pour éliminer la totalité du surnageant. Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM). L'ADN simple brin est traité par un demi-volume de phénol puis par un demi-volume de Chloroforme/alcool isoamylique pour éliminer les protéines des particules phagiques. L'ADN est précipité, et les culots sont regroupés dans 10 µl d'eau.

C) Techniques de biologie moléculaire.

I) Extraction et purification d'ADN.

La préparation d'ADN a été effectuée à l'aide de kit de purification Concert Rapid plasmid midi-prep (Gibco BRL), ou Spin midi ou minipreps kit (Quiagen) pour les plasmides destinés au séquençage.

Les préparations rapides de plasmides ont été effectuées par lyse alcaline [Sambrook et coll., 1989].

La préparation d'ADN du phage lambda 1A16 [Kohara et coll., 1987] a été réalisée selon la méthode de Sambrook et coll. [Sambrook et coll., 1989].

II) Enzymes de restriction et de modification

- les endonucléases de restriction sont utilisées dans les conditions recommandées par le fournisseur.

- La ligation est réalisée grâce à l'ADN-ligase du bactériophage T4 (Gibco BRL), dans le tampon fourni et incubée à 4°C durant 12 h.

- Le fragment Klenow de l'ADN-polymérase I est utilisé dans le tampon fourni, pour digérer ou boucher en présence des didésoxynucléotides triphosphates (2 mM) les extrémités cohésives (dans les proportions de 1 unité pour 1 µg d'ADN) à 20°C durant 20 min. La réaction est arrêtée par de chauffage à 65°C durant 15 min.

III) Electrophorèse

L'analyse des fragments de restriction est réalisée après électrophorèse en gel d'agarose (0, 8 à 1%) en présence de bromure d'éthidium (1 µg/ml) et de Rnase (4 µg/ml ; Sigma) dans un tampon TBE (Tris 89 mM ; Acide Borique 89 mM ; EDTA 2mM). Le kit geneClean III a été utilisé pour extraire les bandes d'ADN séparées sur gel d'agarose.

IV) Mutagenèse dirigée.

1) Phosphorylation des Oligonucléotides.

2 µg d'oligonucléotides sont phosphorylés par 10 unités de polynucléotides kinase du bactériophage T4 (biolabs) dans le tampon kinase fourni et de l'ATP (10 mM, pH 7) (volume final de la réaction 15 µl) durant 45 min à 37°C. La réaction est arrêtée par chauffage à 65°C durant 10 min.

2) Hybridation et synthèse du brin complémentaire.

L'hybridation est réalisée entre 1 picomoles d'ADN simple brin (contenant des bases uraciles) et 20 picomoles d'oligonucléotides phosphorylés dans un volume final de 23 µl contenant du tampon (2,3 µl) d'hybridation du kit de séquençage Cy5 Autoread sequencing Kit. Ce mélange est chauffé 1 min à 70°C puis refroidi lentement jusqu'à 30°C et mis dans la glace.

A ce mélange est ajouté les quatre dNTP (0,75 mM final), de l'ATP (0,75 mM final), 2,5 unités d'ADN polymérase du bactériophage T4 (Biolabs) et 2 unités ADN ligase du bactériophage T4 (Gibco BRL). La réaction de polymérisation est réalisée à 37°C durant 2h30.

Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont les suivants :

Oligonucléotide D285A : 5'-CATTCTTAGTG■CAGTTATAACTTGG-3'

Oligonucléotide D346A : 5'-GTGGTGCTGG■TGCTGACTCG-3'

Oligonucléotide D449A : 5'-CTGTCACATG■CTTCGTGGAAGCG-3'

3) Obtention des clones mutants

Le mélange précédent contenant des plasmides avec un brin non muté contenant des bases uracile et un brin potentiellement muté contenant des bases thymine est utilisé pour transformer la souche XL1 blue (*Ung⁺*, *Dut⁺*). Le brin contenant les bases uracile est éliminé ;

et le brin potentiellement muté sert donc de matrice pour recomposer le second brin. La présence de mutation ponctuelle est vérifiée par séquençage.

V) Séquençage nucléotidique.

Le séquençage est réalisé suivant la méthode de Sanger et coll. [Sanger et coll., 1977], soit en utilisant le kit de séquençage Cy5 Autoread Sequencing Kit, soit en utilisant le Kit PCR Thermo Sequence Cy 5 dye terminator kit (tous deux de Pharmacia Biotech). Le marquage des fragments d'ADN simple brin est réalisé par l'introduction d'un nucléotide modifié par l'ajout du cytochrome Cy5. L'appareil de séquençage utilisé était le Alfexpress DNA Sequencer. La séparation des produits est effectuée par électrophorèse (40 mA, durant 700 min) sur gel de polyacrylamide 6% (acrylamide/bisacrylamide 19/1) à l'aide d'un tampon urée (TBE ; urée). La Détection de la fluorescence des fragments marqués par le cytochrome s'effectue à 700 nm. L'analyse des résultats s'effectue grâce au logiciel Alfwin version 1.10.

Le séquençage a été réalisé pour déterminer les points d'insertion de l'épitope EP31*Bam*HI. Pour cela l'amorce 5'-CCT TTC CCG TTT TCC ATC C-3'OH, située dans l'épitope, a été utilisée. Les amorces universelle et reverse fournies par les kits ont été utilisées pour vérifier la présence des mutations ponctuelles dans la séquence du gène *mdoH*. Le séquençage s'est effectué dans les deux sens sur les fragments contenant les mutations ponctuelles.

D) Techniques Biochimiques.

I) Marquage radioactif des OPG.

L'utilisation d'une souche *pgi zwf* (figure 7) permet un marquage spécifique des OPG sur la chaîne glucosidique lorsque la souche est incubée dans un milieu LOS contenant de glucose (U-¹⁴C) glucose (0,24 mM, 125 MBq/mmol). Le marquage des OPG sur le glycérol, dans cette même souche, est réalisé en milieu LOS contenant du 2-³H glycérol (0,45 mM, 296 MBq/mmol) et du glucose froid (0,24 mM).

Un marquage quantitatif des OPG sur le glycérol est effectué à l'aide d'une souche *glpD3*, *glpK4*, *glpR2* en milieu LOS contenant soit du 2-³H glycérol (0,45 mM, 296 MBq/mmol) pour un dosage classique des OPG, soit du 2-³H glycérol (0,45 mM ; 1850 Mbq/mmol) pour obtenir le substrat (OPG substitués par le phosphoglycérol) nécessaire à la réaction de l'activité de la phosphoglycérol-transférase II. Les cultures sont incubées durant la nuit.

II) Extraction des OPG.

1) Extraction des OPG radio-marqués.

La méthode d'extraction [Kennedy, 1982] utilisée fait intervenir de l'acide trichloroacétique (TCA) dans lequel les OPG restent solubles tandis que les macromolécules sont précipitées. 0,2 volumes de TCA 30% (acide trichloroacétique) et 0,2 volumes de sérum-albumine bovine 5% (entraîneur) sont ajoutés à 1 volume de culture. Ce mélange est agité à 400 rpm pendant 10 min et centrifugé à 3500 g à 4°C 10 min. 0,4 volume de suspension de charbon (50mg/ml) est ajouté au surnageant récupéré précédemment, et agité à 400 rpm durant 10 min, permettant l'adsorption des OPG sur le charbon actif, puis centrifugé à 3500 g durant 5 min. Après deux rinçages à l'eau distillée, destinés à éliminer la radioactivité non spécifique, les molécules adsorbées sur le charbon actif sont extraites deux fois par 0,2 volumes de pyridine aqueuse 15%. Le comptage de la radioactivité des échantillons est réalisé en phase liquide à l'aide d'un compteur à scintillation Beckmann ; le liquide scintillant utilisé est l'Aquasafe 300 plus (Zinsser Analytic).

Les OPG extraits dans la pyridine sont purifiés en fonction de leur taille sur une colonne de filtration sur gel Biogel P4 ($\varnothing = 1,5$ cm; L = 65 cm) et élués par l'acide acétique 0,5 % en fractions de 1,5 ml à 15ml/h.

2) Extraction des OPG en grande quantité.

Une culture de 200 ml est centrifugée à 4°C, 15 min à 5000 g. Le culot de cellules est repris dans 1/40^{ème} de volume d'eau puis traité par le TCA (5% final) pendant 30 min sous une forte agitation. Après une centrifugation de 10 min à 15000 g, le surnageant est neutralisé par addition de NH₄OH 10% et concentré jusqu'à un volume minimal à l'aide d'un évaporatoire rotatif. Si la quantité de cellules est importante, le concentré est traité par un mélange chloroforme/méthanol 2/1 (vol/vol).

Le matériel glucidique est repris dans un volume minimum de tampon d'élution (Acétate d'ammonium 0,15 M, propanol 7%) et déposé sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-25 ($\varnothing = 2$ cm ; L = 45 cm). Des fractions de 1,5 ml sont éluées à la vitesse de 15 ml/h.

Un aliquote de 10 μ l de chaque fraction est déposé sur une couche mince de gel de silice (gel de silice 60 d'une épaisseur de 0,2 mm sur feuille d'aluminium ; Merck). Les OPG sont révélés par pulvérisation d'orcinol sulfurique (orcinol 2g/l dans l'acide sulfurique 20%) et chauffage de la plaque à 110°C pendant quelques minutes. Les fractions repérées sont

ensuite rassemblées et concentrées. Une quantification du sucre est réalisée par méthode colorimétrique utilisant le réactif à l'anthrone [Spiro, 1966].

III) Analyses structurales des OPG.

1) Analyse du caractère anionique des OPG.

La séparation selon la charge est réalisée sur une colonne de DEAE Sephacel pH 7,4 ($\varnothing=1,5$ cm ; L = 40 cm) (Pharmacia Biotech). A ce pH de 7,4, seul les substituants tels que les résidus de phosphoglycérol et de succinate apportent la charge négative [Lacroix et coll., 1999]. La colonne est équilibrée par un tampon Tris HCl 10 mM pH 7,4 et les OPG, purifiés sur colonne de filtration sur gel, sont déposés. La colonne est ensuite éluée par le tampon d'équilibrage Tris HCl 10 mM (60 ml) et les OPG anioniques sont élués par 5 tampons successifs (60 ml chacun) contenant du Tris HCl 10 mM pH 7,4 et des concentrations successives de NaCl 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M et 1 M.

2) Analyse structurale du squelette glucosidique.

-Désubstitution du squelette glucosidique.

Les liaisons éther (Résidus succinyles) des OPG purifiés sur colonne de filtration sur gel sont éliminées par traitement alcalin : les OPG sont traités par un volume de KOH 100mM à 25°C durant 2h. Les OPG ainsi dépourvus de résidus de succinate sont purifiés sur colonne PD10 ($\varnothing= 1,5$ cm ; L = 5,5 cm) (Pharmacia biotech), concentrés et lyophilisés dans un tube de polypropylène. Le lyophilisat est repris dans 500 μ l d'acide fluorhydrique 4N (HF) et incubé 64 h à 4°C. L'acide fluorhydrique excédentaire est éliminé par l'ajout un excès d'hydroxyde de lithium (LiOH) saturé (5 volumes minimums). La solution est ensuite neutralisée par l'ajout de Dowex 50X8 sous forme H^+ . Les Liaisons phosphodiester (résidus de phosphoéthanolamine et de phosphoglycérol) sont éliminées par ce traitement. Les OPG sont ensuite dessalés sur colonne de filtration sur gel Biogel P2 ($\varnothing= 1,5$ cm, L = 52 cm) élués par de l'eau en fraction de 1ml à 15ml/h. Les fractions sont regroupées et lyophilisées.

-Analyse du squelette glucosidique en spectrométrie de masse.

L'analyse est effectuée en MALDI-TOF. La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydrobenzoic [Stahl et coll., 1991] [Stahl et coll., 1994].

-Analyse du squelette glucosidique en chromatographie en phase gazeuse.

200 μ g d'OPG désubstitués sont nécessaire pour la réaction. L'extrémité réductrice de

la chaîne glucosidique est réduite par l'action du Borodeuterate de sodium (250 µl à 20 mg/ml) durant 4h à 25°C. L'analyse des liaisons glucosidiques est effectuée suivant la méthode de Paz Parente et coll. [Paz Parente et coll., 1984]. Les dérivés d'éther de méthyles obtenus sont alors hydrolysés acide Trifluoroacétique (4N à 100°C durant 4h), réduits une nouvelle fois avec le Borodeuterate de sodium et peracétylés. Les dérivés partiellement méthylés et acétylés sont analysés sur une chromatographie en phase gazeuse GC-MS.

IV) Extraction des protéines périplasmiques.

Cette méthode est une adaptation de celle décrite par Neu et Heppel [Neu et coll., 1965]. Une culture est incubée jusqu'à une densité cellulaire de 6.10^8 cellules/ml sous agitation dans un milieu LB dépourvu de NaCl puis centrifugée à 7000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot est lavé 2 fois à 4°C par une quantité de tampon (Tris HCl 0,01 M pH 8,1 ; PMSF 1 mM (Phénylméthylsulfonylfluorure)) 40 fois supérieure au poids des cellules. Ensuite, le culot est resuspendu à 24°C dans un tampon (Tris HCl 0,03 M pH 8, saccharose 20 %, PMSF 1 mM) de façon à obtenir 10^{10} cellules/ml. Pendant 15 min, de l'EDTA est ajouté goutte à goutte jusqu'à une concentration de 1 mM sous une agitation douce. La culture est ensuite laissée 15 min dans la glace puis centrifugée à 7000 g à 4°C durant 5 min. L'activité de la β -galactosidase cytoplasmique des culots est 216 fois supérieure à celle mesurée dans le surnageant, montrant que ce dernier contient essentiellement les protéines périplasmiques.

V) Dosage des protéines.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode utilisant le réactif de Folin [Lowry et coll., 1951] ; une solution de sérum-albumine bovine est utilisée pour la gamme étalon.

VI) Dosage des activités enzymatiques.

1) Dosage de l'activité phosphoglycérol-transférase II.

De la sérum-albumine bovine (5 mg) est ajoutée aux protéines périplasmiques afin de repérer plus facilement les fractions exclues. Ce mélange est chromatographié sur une colonne de filtration sur gel Sephadex G-50 ($\varnothing = 1$ cm, L = 18 cm). L'absorbance à 260 nm de chaque fraction de 1 ml est mesurée afin de déterminer celles qui possèdent les protéines périplasmiques exclues immédiatement (MM > 30 kDa). Ces fractions sont regroupées et les protéines sont concentrées à l'aide de tubes Microsep 30K (Pall Filtron) durant 4 à 5 h jusqu'à un volume de 350 µl à 400 µl.

20 µl de tampon (Tris HCl 500 mM pH 7,8, sérum-albumine bovine 25 mg/ml, MnCl₂ 2,5 mM) et 35 µl d'OPG (20 µM) marqués à l'aide du 2-³H glycérol (200 000 dpm) sont ajoutés à 145 µl de protéines périplasmiques concentrées et incubés à 37°C durant 1 h, 2 h ou 3 h. Puis 1 ml de suspension de charbon (20 mg/ml) est ajouté pour arrêter la réaction. Les tubes sont agités vigoureusement 4 fois à 400 rpm durant 10 min. Ensuite, une centrifugation de ces tubes à 8000 g durant 10 min permet de récupérer, dans le surnageant, le 2-³H glycérol libéré non retenu par le charbon [Goldberg et coll., 1981].

2) Dosage de l'activité β-galactosidase.

La mesure de l'activité β-galactosidase est effectuée selon la méthode décrite par Miller [Miller, 1992] à partir de cellules perméabilisées par un mélange chloroforme/SDS/Tampon Z. Les résultats sont exprimés en unités Miller qui correspondent à : µmol ONPG hydrolysé/minute/mg de protéines.

Bibliographie

- Ades S.E., L.E. Connolly, B.M. Alba and C.A. Gross.** (1999). The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* **13.** (18):p.2449-2461.
- Arfin S.M., A.D. Long, E.T. Ito, L. Toller, M.M. Riehle, E.S. Paegle and G.W. Hatfield.** (2000). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem.* **275.** (38):p.29672-29684.
- Arsene F., T. Tomoyasu, A. Mogk, C. Schirra, A. Schulze-Specking and B. Bukau.** (1999). Role of region C in regulation of the heat shock gene-specific sigma factor of *Escherichia coli*, sigma32. *J Bacteriol.* **181.** (11):p.3552-3561.
- Aufrère R., M. Tempête and J.-P. Bohin.** (1986). Regulation of expression of the gene for vitamin B12 receptor cloned on a multicopies plasmid in *Escherichia coli*. *Molecular Genome Genetics.* **205.** 358-365.
- Banta L.M., J. Bohne, D. Lovejoy and K. Dostal.** (1998). Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J. Bacteriol.* **180.** (24):p.6597-6606.
- Becker G. and R. Hengge-Aronis.** (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S . *Mol. Microbiol.* **39.** (5):p.1153-1165.
- Becker G., E. Klauck and R. Hengge-Aronis.** (2000). The response regulator RssB, a recognition factor for σ^S proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti- σ^S factor. *Mol. Microbiol.* **35.** (6):p.657-666.
- Becker G., E. Klauck and R. Hengge-Aronis.** (1999). Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96.** (11):p.6439-6444.
- Begley G.S., K.A. Warner, J.C. Arents, P.W. Postma and G.R. Jacobson.** (1996). Isolation and characterization of a mutation that alters the substrate specificity of the *Escherichia coli* glucose permease. *J Bacteriol.* **178.** (3):p.940-942.

- Bell R.M.** (1974). Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis: macromolecular system in an sn-glycerol-3-phosphate acetyltransferase Km mutant. *Journal of Bacteriology*. **117**. 1065-1076.
- Benz R., G. Francis, T. Nakae and T. Ferenci.** (1992). Investigation of the selectivity of maltoporin channels using mutant LamB proteins: mutations changing the maltodextrin binding site. *Biochim Biophys Acta*. **2**. (2):p.299-307.
- Bhagwat A.A. and D.L. Keister.** (1995). Site-directed mutagenesis of the b-(1-3), b-(1-6)-D-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI*. **8**. (3):p.366-370.
- Bhagwat A.A., A. Mithofer, P.E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel and D.L. Keister.** (1999). Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1->3)-beta-glucosyl. *Plant Physiol*. **119**. (3):p.1057-1064.
- Bhagwat A.A., R.E. Tully and D.L. Keister.** (1993). Identification and cloning of a cyclic beta-(1->3), beta-(1->6)-D-glucan synthesis locus from *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett*. **114**. (2):p.139-144.
- Bianchi A.A. and F. Baneyx.** (1999). Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **34**. (5):p.1029-1038.
- Blattner F.R. and et. al.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**. 1453-1462.
- Bogdanov M. and W. Dowhan.** (1999). Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem*. **274**. (52):p.36827-36830.
- Bohin J.-P.** (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in proteobacteria. *FEMS*. **186**. 11-19.
- Bohin J.P. and E.P. Kennedy.** (1984b). Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **157**. (3):p.956-957.
- Bohin J.-P. and E.P. Kennedy.** (1984a). Regulation of the synthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. **259**. (13):p.8388-9393.

- Botfield M.C., K. Naguchi, T. Tsuchiya and T.H. Wilson.** (1992). Membrane topology of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **267.** (3):p.1818-1822.
- Bowe F., C.J. Lipps, R.M. Tsois, 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. *Inf. Immun.* **66.** (7):p.3372-3377.
- Bradbeer C.** (1993). The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **175.** (10):p.3146-3150.
- Breedveld M.W., J.A. Hadley and K.J. Miller.** (1995). A novel cyclic beta-1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* **177.** (22):p.6346-6351.
- Breedveld M.W. and K.J. Miller.** (1994). Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol Rev.* **58.** (2):p.145-161.
- Breedveld M.W., L.P. Zevenhuizen and A.J. Zehnder.** (1992). Synthesis of cyclic beta-(1,2)-glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion. *J Bacteriol.* **174.** (20):p.6336-6342.
- Broome-Smith J.K., M. Tadayyon and Y. Zhang .** (1990). β -lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* **4.** 1637-1644.
- Buhr A., G.A. Daniels and B. Erni.** (1992). The glucose transporter of *Escherichia coli*. Mutants with impaired translocation activity that retain phosphorylation activity. *J Biol Chem.* **267.** (6):p.3847-3851.
- Busby S. and R.H. Ebright.** (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell.* **79.** (5):p.743-746.
- Campbell J.A., G.J. Davies, V. Bulone and B. Henrissat.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **326.** (Pt 3):p.929-939.
- Carpita N. and C. Vergara.** (1998). A recipe for cellulose. *Science.* **279.** (5351):p.672-673.

- Casadaban M.J. and S.N. Cohen.** (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76.** (9):p.4530-4533.
- Cayley D.S., H.J. Guttman and M.T. Record, Jr.** (2000). Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys J.* **78.** (4):p.1748-1764.
- Chang Y.Y. and E.P. Kennedy.** (1967). Biosynthesis of phosphatidyl glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J Lipid Res.* **8.** (5):p.447-455.
- Charnock S. and G.J. Davies.** (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SssA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochem.* **38.** 6380-6385.
- Charnock S.J., B. Henrissat and G.J. Davies.** (2001). Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides. *Plant Physiol.* **125.** (2):p.527-531.
- Chilcott G.S. and K.T. Hughes.** (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64.** (4):p.694-708.
- Christie P.J.** (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.* **179.** (10):p.3085-3094.
- Cogez V., E. Gak, A. Puskas, S. Kaplan and J.P. Bohin.** (2002). The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* from an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *Eur. J; Biochem.* **269.**
- Cogez V., P. Talaga, J. Lemoine and J.P. Bohin.** (2001). Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol.* **183.** (10):p.3127-3133.
- Cook W.R. and L.I. Rothfield.** (1994). Early stages in development of the *Escherichia coli* cell-division site. *Mol Microbiol.* **14.** (3):p.485-495.

- Cronan J.R. and C.O. Rok.** (1996). Biosynthesis of membrane lipids. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 612-636.
- Dartigalongue C., H. Loferer and S. Raina.** (2001b). EcfE, a new essential inner membrane protease: its role in the regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Embo J.* **20.** (21):p.5908-5918.
- Dartigalongue C., D. Missiakas and S. Raina.** (2001a). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem.* **276.** (24):p.20866-20875.
- Dartigalongue C., H. Nikaido and S. Raina.** (2000). Protein folding in the periplasm in the absence of primary oxidant DsbA: modulation of redox potential in periplasmic space via OmpL porin. *Embo J.* **19.** (22):p.5980-5988.
- de Gier J.W. and J. Luirink.** (2001). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **40.** (2):p.314-322.
- De lorenzo V. and K.N. Timmis.** (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn 5- and Tn 10-derived minitransposons. *Meth. Enz.* **235.** 386-405.
- Debarbieux.** (1995). Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli* : analyse topographique et étude de l'expression de la glucosyltransférase membranaire MdoH. *Thèse soutenue à l'université des sciences et technologies de Lille.*
- Delcour A.H., J. Adler, C. Kung and B. Martinac.** (1992). Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *Escherichia coli* porin channel. *FEBS.* **304.** (2,3):p.216-220.
- Douglas C.J., R.J. Staneloni, R.A. Rubin and E.W. Nester.** (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J Bacteriol.* **161.** (3):p.850-860.

- Dénarié J., F. Debellé and Promé J-C.** (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecule mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**. p.503-535.
- Dutta R., T. Yoshida and M. Inouye.** (2000). The critical role of the conserved Thr247 residue in the functioning of the osmosensor EnvZ, a histidine Kinase/Phosphatase, in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275**. (49):p.38645-38653.
- Dylan T., D.R. Helinski and G.S. Ditta.** (1990a). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1----2)-glucan. *J Bacteriol.* **172**. (3):p.1400-1408.
- Dylan T., P. Nagpal, D.R. Helinski and G.S. Ditta.** (1990b). Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti* *ndv* mutants. *J Bacteriol.* **172**. (3):p.1409-1417.
- Ebel W., G.J. Vaughin, H.K. Peters III and J.E. Trempey.** (1997). Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**. (21):p.6858-6861.
- Espinosa-Urgel M., C. C. and A. Tormo.** (1996). A consensus structure for σ^S -dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **21**. (3):p.657-659.
- Fiedler W. and H. Roterling.** (1988). Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**. (29):p.14684-14689.
- 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**. (8):p.4799-4806.
- Gaal T., W. Ross, S.T. Estrem, L.H. Nguyen, R.R. Burgess and R.L. Gourse.** (2001). Promoter recognition and discrimination by $E\sigma^S$ RNA polymerase. *Mol Microbiol.* **42**. (4):p.939-954.
- Galan B., A. Kolb, J.L. Garcia and M.A. Prieto.** (2001). Superimposed levels of regulation of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **276**. (40):p.37060-37068.

- Garinot-Schneider C., A.C. Lellouch and R.A. Geremia.** (2000). Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM. *J Biol Chem.* **275.** (40):p.31407-31413.
- Gaspar J.A., J.A. Thomas, C.L. Marolda and M.A. Valvano.** (2000). Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol Microbiol.* **38.** (2):p.262-275.
- 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.** (4):p.1410-1413.
- Geremia R.A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares and R.A. Ugalde.** (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan. *J Bacteriol.* **169.** (2):p.880-884.
- Goldberg D.E., M.K. Rumley and E.P. Kennedy.** (1981). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: A periplasmic phosphoglyceroltransferase. *PNAS.* **78.** (9):p.5513-5517.
- Goldman R.C., D. White, F. Orskov, I. Orskov, P.D. Rick, M.S. Lewis, A.K. Bhattacharjee and L. Leive.** (1982). A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol.* **151.** (3):p.1210-1221.
- Gopalakrishnan A.S., Y.C. Chen, M. Temkin and W. Dowhan.** (1986). Structure and expression of the gene locus encoding the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **261.** (3):p.1329-1338.
- Graham L.L., T.J. Beveridge and N. Nanninga.** (1991). Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends Biochem Sci.* **16.** (9):p.328-329.

- Gross C.A.** (1996). Function and regulation of the heat shock protein. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 1382-1399.
- 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**. (2):p.245-248.
- Hawrot E. and E.P. Kennedy.** (1976). Conditional lethal phosphatidylserine decarboxylase mutants of *Escherichia coli*. Mapping of the structural gene for phosphatidylserine decarboxylase. *Mol Gen Genet.* **148**. (3):p.271-279.
- Heilpern A.J. and M.K. Waldor.** (2000). CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. *J Bacteriol.* **182**. (6):p.1739-1747.
- Helmann J.D. and M.J. Chamberlin.** (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem.* **57**. 839-872.
- Henderson I.R. and J.P. Nataro.** (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* **69**. (3):p.1231-1243.
- Hengge-Aronis R.** (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* **2**. (2):p.148-152.
- Hengge-Aronis R.** (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 1497-1512.
- Hobot J.A., E. Carlemalm, W. Villiger and E. Kellenberger.** (1984). Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J Bacteriol.* **160**. (1):p.143-152.

- Holtje J.V.** (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62.** (1):p.181-203.
- Holtje J.V., W. Fiedler, H. Roterling, B. Walderich and J. van Duin.** (1988). Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem.* **263.** (8):p.3539-3541.
- Hommais F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J.-P. Le Caer, A. Danchin and P. Bertin.** (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* **40.** (1):p.20-36.
- Horii Z. and A.J. Clark.** (1973). Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol.* **80.** (2):p.327-344.
- Icho T. and C.R. Raetz.** (1983). Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol.* **153.** (2):p.722-730.
- IUBMB.** (1992). Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology. *Academic press, San diego.*
- 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.** (3):p.976-981.
- Jackson B.J. and A.P. Kennedy.** (1983). The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **258.** (4):p.2394-2398.
- Jishage M. and A. Ishihama.** (1999). Transcriptional organisation and *in vivo* role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. *J. Bacteriol.* **181.** (12):p.3768-3776.

- Jishage M. and A. Ishihama.** (1995). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J Bacteriol.* **177.** (23):p.6832-6835.
- Kadner.** (1996). Cytoplasmic membrane. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 58-87.
- Kallipolitis B.H. and P. Valentin-Hansen.** (1998). Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator sigma32, is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Mol Microbiol.* **29.** (4):p.1091-1099.
- Kastowsky M., T. Gutberlet and H. Bradaczek.** (1992). Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* **174.** (14):p.4798-4806.
- Kennedy E.P.** (1982). Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *PNAS.* **79.** 1092-1095.
- Kloser A., M. Laird, M. Deng and R. Misra.** (1998). Modulations in lipid A and phospholipid biosynthesis pathways influence outer membrane protein assembly in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* **27.** (5):p.1003-1008.
- Kohara Y., K. Akiyama and K. Isono.** (1987). The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell.* **50.** (3):p.495-508.
- Kosciarz E.** (1995). Approche génétique des interactions d'une glucosyltransférase membranaire avec d'autres protéines. *DEA de l'université des sciences et technologies de Lille.*
- Kunkel T.A.** (1985). The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *J Biol Chem.* **260.** (23):p.12866-12874.

- Kusano S., Q. Ding, N. Fujita and A. Ishihama.** (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J Biol Chem.* **271.** (4):p.1998-2004.
- Lacroix J.-M.** (1989b). Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. *Thèse soutenue à l'université de Paris-Sud, centre d'ORSAY.*
- Lacroix J.-M., E. Lanfroy, V. Cogez, Y. Lequette, A. Bohin and J.-P. Bohin.** (1999). The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **181.** (12):p.3626-3631.
- 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.** (7):p.1754-1753.
- Lacroix J.-M., M. Tempête, B. Menichi and J.-P. Bohin.** (1989a). Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3.** (9):p.1173-1182.
- Lanfroy E.** (1997). La substitution des glucanes périplasmiques osmorégulés d'*Escherichia coli*. *Thèse de l'université de Paris-sud, Centre d'Orsay.*
- Lange R. and R. Hengge-Aronis.** (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8.** (13):p.1600-1612.
- Lazdunski C.J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubes and H. Benedetti.** (1998). Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **180.** (19):p.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.* **177.** 191-197.
- Lease R.A. and M. Belfort.** (2000). Riboregulation by *DsrA* RNA: *trans-actions* for global economy. *Mol. Microbiol.* **38.** (4):p.667-672.

- Lightfoot J. and J.S. Lam.** (1991). Molecular cloning of genes involved with expression of A-band lipopolysaccharide, an antigenically conserved form, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **173.** (18):p.5624-5630.
- Link A.J., K. Robison and G.M. Church.** (1997a). Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis.* **18.** 1259-1313.
- Lippens G., J.-M. Wieruszeski, D. Horvath, P. Talaga and J.-P. Bohin.** (1998). Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucans of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. *J Am Chem Soc.* **120.** 170-177.
- Lonetto M., M. Gribskov and C.A. Gross.** (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol.* **174.** (12):p.3843-3849.
- 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.** (2):p.329-340.
- low D., B. Braaten and M. Van Der Woude.** (1996). Fimbriae. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 146-157.
- Lowry O.H., N.J. Rosenberg, A.L. Farr and R.J. Randall.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* **193.** 265-275.
- 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.** (23):p.7515-7522.
- Macnab R.M.** (1999). The bacterail flagellum: Reversible rotary propellar and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* **181.** (23):p.7149-7153.

- Macnab R.M.** (1996). Flagella and Motility. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 123-145.
- Mahajan-Miklos S., M.-W. Tan, L.G. Rahme and F.M. Ausubel.** (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using *Pseudomonas aeruginosa-Ceanorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 47-56.
- Majdalani N., S. Chen, J. Murrow, K. Saint John and S. Gottesman.** (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.* **39.** (5):p.1382-1394.
- Maloney P.C. and T.H. Wilson.** (1996). Ion-coupling transport and transporters. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.*
- Manoil C. and J. Bailey.** (1997). A simple screen permissive sites proteins: analysis of *Escherichia coli lac* permease. *Journal of Molecular Biology.* **267.** 250-263.
- McIntire F.C., W.H. Peterson and A.J. Richer.** (1942). *J Biol Chem.* **143.** 491-496.
- Miller J.H.** (1992). A short course in bacterial genetics. *A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor Laboratory Press.*
- Miller K.J., E.P. Kennedy and V.N. Reinhold.** (1986). Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science.* **231.** (4733):p.48-51.
- Minagawa J., H. Nakamura, I. Yamato, T. Mogi and Y. Anraku.** (1990). Transcriptional regulation of the cytochrome b562-o complex in *Escherichia coli*. Gene expression and molecular characterization of the promoter. *J Biol Chem.* **265.** (19):p.11198-11203.

- Minton N.P.** (1984). Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *gene*. **31**. 269-273.
- Missiakas D. and S. Raina.** (1997a). Protein folding in the bacterial periplasm. *J Bacteriol.* **179**. (8):p.2465-2471.
- Molloy M.P., B.R. Herbert, M.B. Slade, T. Rabilloud, A.S. Nouwens, K.L. Williams and A.A. Gooley.** (2000). Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem.* **267**. (10):p.2871-2881.
- Morita M., M. Kanemori, H. Yanagi and T. Yura.** (1999). Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol.* **181**. (2):p.401-410.
- Muffler A., D.D. Traulsen, D. Fischer, R. Lange and R. Hengge-Aronis.** (1997b). The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**. (1):p.297-300.
- Mukhopadhyay P., J. Williams and D. Mills.** (1988). Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol.* **170**. (12):p.5479-5488.
- Neu H.C. and L.A. Heppel.** (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *Journal of Biological Chemistry.* **240**. (9):p.3685-3690.
- Nguyen L.H. and R.R. Burgess.** (1997). Comparative analysis of the interactions of *Escherichia coli* sigma S and sigma 70 RNA polymerase holoenzyme with the stationary-phase-specific bolAp1 promoter. *Biochem.* **36**. (7):p.1748-1754.
- Nikaido.** (1996). Outer Membrane. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology.* 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 29-47.
- Nikaido H.** (1999a). Microdermatology: Cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* **181**. (1):p.4-8.

- Notley-McRobb L. and T. Ferenci.** (2000). Substrate specificity and signal transduction pathways in the glucose-specific enzyme II (EII(Glc)) component of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Bacteriol.* **182.** (16):p.4437-4442.
- Oh H., Y. Park and C. Park.** (1999). A mutated PtsG, the glucose transporter, allows uptake of D-ribose. *J Biol Chem.* **274.** (20):p.14006-14011.
- Ohnuma M., N. Fujita, A. Ishihama, K. Tanaka and H. Takahashi.** (2000). A carboxy-terminal 16-amino-acid region of σ^{38} of *Escherichia coli* is important for transcription under high-salt conditions and sigma activities *in vivo*. *J. Bacteriol.* **182.** (16):p.4628-4631.
- Oliver D.B.** (1996). Periplasm. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 88-122.
- 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.** (10):p.3134-3141.
- Park J.T.** (1996). The murein sacculus. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 48-57.
- Paz Parente J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Motreuil, B. Fournet and G. Ricard.** (1984). A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbocation. *Carbohydrate Research.* **141.** 41-47.
- 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 $\rightarrow$ 3) cyclic glucan. *Carbohydr Res.* **296.** 23-37.
- Pluschke G., Y. Hirota and P. Overath.** (1978). Function of phospholipids in *Escherichia coli*. Characterization of a mutant deficient in cardiolipin synthesis. *J Biol Chem.* **253.** (14):p.5048-5055.

- Postma P.W.** (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1149-1174.*
- Racker, E.** (1967). Resolution and reconstitution of the inner mitochondrial membrane. *Fed. Proc.* **26.** (5):p. 1335-1340.
- Raetz C.R.** (1986). Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu Rev Genet.* **20.** 253-295.
- Raetz C.R. and E.P. Kennedy.** (1974). Partial purification and properties of phosphatidylserine synthetase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **249.** (16):p.5083-5045.
- Raina S., D. Missiakas and C. Georgopoulos.** (1995). The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo J.* **14.** (5):p.1043-1055.
- Raivio T.L. and T.J. Silhavy.** (1999). The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol.* **2.** (2):p.159-165.
- Record M.T., W. Reznikoff, M.L. Graig, K.L. McQuade and P.J. Schalkx.** (1996). *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), Promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C. 792-821.*
- Rick P.D., G.L. Hubbard, M. Kitaoka, H. Nagaki, T. Kinoshita, S. Dowd, V. Simplaceanu and C. Ho.** (1998). Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology.* **8.** (6):p.557-567.

- Rietveld A.G., J.A. Killian, W. Dowhan and B. de Kruijff.** (1993). Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268.** (17):p.12427-12433.
- Rojo F.** (1999). Repression of transcription initiation in bacteria. *J. Bacteriol.* **181.** (10):p.2987-2991.
- 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 beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim Biophys Acta.* **12.** (3):p.215-225.
- Rouviere P.E., A. De Las Penas, J. Mecsas, C.Z. Lu, K.E. Rudd and C.A. Gross.** (1995). rpoE, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *Embo J.* **14.** (5):p.1032-1042.
- Rowe S., N. Hodson, G. Griffiths and I.S. Roberts.** (2000). Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster: evidence for the roles of H-NS, BipA, and integration host factor in regulation of group 2 capsule gene clusters in pathogenic *E. coli*. *J Bacteriol.* **182.** (10):p.2741-2745.
- Ruijter G.J., G. van Meurs, M.A. Verwey, P.W. Postma and K. van Dam.** (1992). Analysis of mutations that uncouple transport from phosphorylation in enzyme II_{Glc} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol.* **174.** (9):p.2843-2850.
- Rumley M.K., H. Therisod, A.C. Weissborn and E.P. Kennedy.** (1992). Mechanisms of regulation of the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **267.** (17):p.11806-11810.
- Sambrook J.E., F. Fritsch and T. Maniatis.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger F., S. Nicklen and A.R. Coulson.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Procedures National Academy of Sciences.* **74.** 5463-5467.
- Sara M. and U.B. Sleytr.** (2000). S-Layer proteins. *J Bacteriol.* **182.** (4):p.859-868.

- Saxena I.M., R.M. Brown jr, M. Fevre, R.A. Geremia and B. Henrissat.** (1995). Multidomain architecture of β -glycosyl transferase implication for mechanism of action. *J. Bacteriol.* **177.** (6):p.1419-1424.
- Schneider J.E., V. Reinhold, M.K. Rumley and E.P. Kennedy.** (1979). Structural studies of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254.** (20):p.10135-10138.
- Sharff A., C. Fanutti, J. Shi, C. Calladine and B. Luisi.** (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur J Biochem.* **268.** (19):p.5011-5026.
- Shevchik V.E., J. Robert-Baudouy and G. Condemine.** (1997). Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *Embo J.* **16.** (11):p.3007-3016.
- Skorko-Glonek J., B. Lipinska, K. Krzewski, G. Zolese, E. Bertoli and F. Tanfani.** (1997). HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem.* **272.** (14):p.8974-8982.
- Soberon X., L. Covarrubias and F. Bolivar.** (1980). Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene.* **9.** (3-4):p.287-305.
- Sperandio V., J.L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin and J.B. Kaper.** (1999). Quorum sensing control expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS.* **96.** (26):p.15196-15201.
- Spiro R.G.** (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. *Meth. Enz.* **8.** 3-27.
- Stahl B., M. Steup, M. Karas and F. Hillenkamp.** (1991). Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical of Biochemistry.* **63.** 1463-1466.

- Stahl B., S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup and G. Sawatski.** (1994). Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical of Biochemistry*. **223**. 218-226.
- Stanfield SW., Ielpi L., O'Brochta D, Helinski and Ditta GS.** (1988). The NdvA gen product of *Rhizobium meliloti* is required for beta-(1----2) glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. 170(8): p.3522-3530.
- Stanley N.R., K. Findlay, B.C. Berks and T. Palmer.** (2001). *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**. (1):p.139-144.
- Stock J.B., B. Rauch and S. Roseman.** (1977). Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**. (21):p.7850-7861.
- 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**. (3):p.597-605.
- Talaga P. V. Cogez, J.M. Wieruszeski, B. Sthal, J. Lemoine, G. Lippens and J.P. Bohin.** (2002). Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeraoides*. *Eur. J. Biochem.* **269**.
- Talaga P., B. Fournet and J.-P. Bohin.** (1994). Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **176**. (21):p.6538-6544.
- Talaga P., B. Stahl, J.M. Wieruszeski, 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**. (8):p.2263-2271.
- 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**. (11):p.3697-3705.

- Tarbouriech N., S.J. Charnock and G.J. Davies.** (2001). Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP Complexes of the Family GT-2 Glycosyltransferase SpsA: A Comparison with Related NDP-sugar Glycosyltransferases. *J Mol Biol.* **314.** (4):p.655-661.
- 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.** (23):p.8235-8238.
- Travo P., H. Muller and F. Schuber.** (1979). Calf spleen NAD glycohydrolase. Comparison of the catalytic properties of the membrane-bound and the hydrosoluble forms of enzyme. *Eur. J. Biochem.* **96.** (1):p.141-149.
- Tsvetkova N.M., B.L. Phillips, L.M. Crowe, J.H. Crowe and S.H. Risbud.** (1998). Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ³¹P NMR and FTIR studies. *Biophys J.* **75.** (6):p.2947-2955.
- Valentine P., B.P. Devore and F. Heffron.** (1998). Identification of three attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Inf. Immun.* **66.** (7):p.3378-3383.
- 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*. *PNAS.* **70.** (5):p.1368-1372.
- Vanden Boom T. and J.E. Cronan, Jr.** (1989). Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu Rev Microbiol.* **43.** 317-343.
- Vieira J. and J. Messing.** (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19.** 259-268.
- Vinopal R.T., J.D. Hillman, H. Schulman, W.S. Reznikoff and D.G. Fraenkel.** (1975). New phosphoglucose isomerase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122.** 1172-1174.

- Wang P., C. Ingram-Smith, J.A. Hadley and K.J. Miller.** (1999). Cloning, sequencing and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **181.** (15):p.4576-4583.
- Wanner B.L.** (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Maganasik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger.(ed.), Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 1357-1382.
- Weiner J.H., G. Shaw, R.J. Turner and C.A. Trieber.** (1993). The topology of the anchor subunit of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268.** (5):p.3238-3244.
- Weiss A.A., F.D. Johnson and D.L. Burns.** (1993). Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90.** (7):p.2970-2974.
- Weissborn A.C. and E.P. Kennedy.** (1984). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **259.** (20):p.12644-12651.
- Weissborn A.C., M.K. Rumley and E.P. Kennedy.** (1991). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Membrane-bound glucosyltransferase system from *Escherichia coli* requires polyprenyl phosphate. *J Biol Chem.* **266.** (13):p.8062-8067.
- Whitfield C. and I.S. Roberts.** (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **31.** (5):p.1307-1319.
- Woldringh C.L.** (1994). Significance of plasmolysis spaces as markers for periseptal annuli and adhesion sites. *Mol Microbiol.* **14.** (4):p.597-607.
- Wu L.F., C. Navarro and M.A. Mandrand-Berthelot.** (1991). The *hydC* region contains a multi-cistronic operon (*nik*) involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene.* **107.** (1):p.37-42.
- Yannisch-Perron V., J. Vieira and J. Messing.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33.** 103-119.

- Yura T. and K. Nakahigashi.** (1999). Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol.* **2.** (2):p.153-158.
- Zhang A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis and G. Storz.** (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-1) protein. *EMBO J.* **17.** (20):p.6061-6068.
- Zorreguieta A., S. Cavaignac, R.A. Geremia and R.A. Ugalde.** (1990). Osmotic regulation of beta(1-2) glucan synthesis in members of the family Rhizobiaceae. *J Bacteriol.* **172.** (8):p.4701-4704.
- Zorreguieta A., R.A. Geremia, S. Cavaignac, G.A. Cangelosi, E.W. Nester and R.A. Ugalde.** (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol Plant Microbe Interact.* **1.** (3):p.121-127.
- 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.** (3):p.947-951.

Titre : Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli* : analyse fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH et caractérisation de deux nouvelles activités.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont présents chez toutes les Protéobactéries testées, où ils peuvent représenter jusqu'à 5% du poids sec de la bactérie. Leur biosynthèse est d'autant plus importante que l'osmolarité du milieu est faible.

Les OPG d'*E. coli* sont formés d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2 et ramifiés par des résidus de glucose liés en β -1,6. Ces OPG peuvent être substitués par des résidus de phosphoglycérol, de succinate et de phosphoéthanolamine.

Un opéron de deux gènes (*mdoGH*) soumis à une régulation osmotique est nécessaire à la biosynthèse du squelette glucosidique. Trois types de mutagenèse (dirigée, ou par greffage d'épitope aléatoire ou localisée) ont été effectués sur cet opéron dans le but d'établir une topologie fonctionnelle de ces deux protéines. Ces mutagenèses ont révélé la présence dans MdoH de deux domaines cytoplasmiques actifs, l'importance d'une boucle périplasmique et la stricte nécessité de 3 résidus d'acide aspartique, conservés dans les glycosyltransférase de la famille 2. Cette approche a aussi révélé l'importance des 80 derniers acides aminés de la protéine MdoG dans sa fonction.

Un gène *mdoD*, paralogue du gène *mdoG*, est impliqué dans la biosynthèse du squelette glucosidique mais n'est pas indispensable. L'expression du gène *mdoD*, étudiée grâce à des fusions traductionnelles, est maintenue à un niveau de base en phase exponentielle et augmentée lors de l'entrée en phase stationnaire et de l'adaptation à une haute osmolarité. L'expression du gène *mdoD* dépend des facteurs de transcription σ^{70} et σ^S et d'un régulateur inconnu.

Le produit du gène *mdoB* responsable de l'activité phosphoglycérol-transférase I membranaire est aussi responsable de l'activité phosphoglycérol-transférase II périplasmique. Nos études indiquent que le transfert du succinate s'effectue simultanément à la biosynthèse du squelette glucosidique et de manière plus tardive et séquentielle pour les résidus de phosphoglycérol.

Mots clefs : bactéries à Gram négatif, enveloppe bactérienne, glucanes périplasmiques osmorégulés, glycosyltransférase, phosphoglycérol transférase.

Title: Biosynthesis of osmoregulated glucans periplasmic: functional analysis of MdoG and MdoH proteins and characterization of two new activities.

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) have been detected in all proteobacteria tested. OPG biosynthesis is enhanced when medium osmolarity decreases. Then OPGs can represent 5% of the bacterial dry weight.

OPGs of *E. coli* have a linear backbone of glucose residues linked by β -1,2 bonds and branched by glucose residues linked by β -1,6 bonds. The polyglucose backbone is substituted by phosphoglycerol, succinate and phosphoethanolamine residues.

In *E. coli*, the *mdoGH* osmoregulated operon encodes two proteins necessary for the assembly of the polyglucose backbone. Three types of mutagenesis (directed, or random and located insertion of epitopes) have been carried out on the operon to establish a functional topology of both proteins. Mutagenesis of MdoH revealed the presence of two cytoplasmic domains, the crucial role of a periplasmic loop and the strict necessity of 3 aspartic acid residues conserved in glycosyltransferase family 2. Similarly, the C-terminal end of MdoG protein appeared important for its activity.

mdoD, a *mdoG* paralog gene, is involved in polyglucose backbone biosynthesis, but is not necessary. The *mdoD* expression was analyzed by translational fusion. This analysis revealed a basal expression during the exponential phase and an increase when cells entered the stationary phase or responded to high osmolarity. The *mdoD* expression is controlled by σ^{70} , σ^S and an unknown regulatory factor.

The *mdoB* gene encodes both the phosphoglycérol-transferase I and the phosphoglycérol-transferase II activities. Succinate substitution occurred concomitantly with the glucosidic backbone biosynthesis while the phosphoglycerol substitution occurred later and sequentially.

Keywords: Gram-negative bacteria, bacterial envelope, osmoregulated periplasmic glucans, glycosyltransferase, phosphoglycerol-transferase.
