

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Présentée par

Eglantine Rollet

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

La biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés : de la démonstration des gènes impliqués chez *Pseudomonas aeruginosa* à l'analyse structurale de protéines impliquées chez *Escherichia coli*

Soutenue le 20 novembre 2006, devant la commission d'examen :

Président :

Pr René Cacan

Rapporteur :

Dr Mirjam Czjzek

Dr Jean-Michel Betton

Examineur :

Dr Isabelle Landrieu

Directeur de Thèse :

Pr Jean-Pierre Bohin

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR8576/CNRS de l'Université de 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 Mirjam Czjzek, le Dr Jean-Michel Betton, le Dr Isabelle Landrieu et Le professeur René Cacan d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Jean-Pierre Bohin de m'avoir accueilli dans son équipe et soutenu afin de réaliser cette thèse.

Je remercie Carmen Ödberg-Ferragut pour ses précieux conseils notamment en biologie moléculaire.

Je remercie toute l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes : Aurélie pour son aide dans la réalisation des spectres de masse, Anne-France et Gilles pour leur bonne humeur et Virginie, Jean-Marie et Franck pour leurs conseils et leurs soutiens:

Je remercie l'ensemble des personnes de cette unité qui m'ont aidé dans ce travail. En particulier Bernadette Coddeville pour les analyses en spectrométrie de masse et Yves Leroy pour les analyses en chromatographie en phase gazeuse.

Je remercie Guy Lippens et son équipe pour leur aide dans la purification des protéines.

Je remercie Vincent Villeret, son équipe et en particulier Bernard Clantin et Prakash Rucktooa qui m'ont initié à la cristallographie des protéines.

Je remercie tout particulièrement mes amis, Karine et mes parents qui m'ont soutenu dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| I. Introduction | 5 |
| 1. Interaction des bactéries avec l'environnement..... | 5 |
| 1.1. L'enveloppe des protéobactéries | 5 |
| 1.1.1. La membrane interne..... | 5 |
| 1.1.1.1. La double couche lipidique | 5 |
| 1.1.1.2. Les protéines | 6 |
| 1.1.2. La membrane externe..... | 7 |
| 1.1.2.1. La double couche lipidique | 7 |
| 1.1.2.2. Les protéines de la membrane externe..... | 9 |
| 1.1.3. Le périplasme..... | 11 |
| 1.1.3.1. Structure et physiologie du périplasme | 12 |
| 1.1.3.2. Le peptidoglycane | 13 |
| 1.1.3.3. Les protéines périplasmiques | 16 |
| 1.1.3.4 Les glucanes périplasmiques osmorégulés..... | 17 |
| 1.1.4. Les structures associées à la membrane externe..... | 17 |
| 1.2. Interaction avec l'hôte | 18 |
| L'exemple de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 |
| 1.2.1. Présentation et implication clinique de <i>P. aeruginosa</i> | 18 |
| 1.2.2. Les voies de sécrétions et les facteurs de virulence externes..... | 19 |
| 1.2.2.1. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type I..... | 19 |
| 1.2.2.2. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type II..... | 20 |
| 1.2.2.3. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type III..... | 21 |
| 1.2.3. Les facteurs de virulence associés à la bactérie..... | 22 |
| 1.2.3.1. Le flagelle | 22 |
| 1.2.3.2. Les pilis de type IV..... | 22 |
| 1.2.3.3. Le LPS | 23 |
| 1.2.4. Les biofilms..... | 24 |
| 1.2.4.1. Formation des biofilms | 24 |
| 1.2.4.1.1. De l'attachement réversible à l'attachement irréversible..... | 24 |
| 1.2.4.1.2. Des microcolonies aux macrocolonies..... | 25 |
| 1.2.4.1.3. Maintenance et dispersion | 26 |
| 1.2.4.2. La matrice..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2.4.2.1. Les exopolysaccharides | 28 |
| 1.2.4.2.2. Les protéines | 32 |
| 1.2.4.2.3 L'ADN..... | 33 |
| 2. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)..... | 34 |
| 2.1. La structure des OPG | 34 |
| 2.1.1. Les OPG de la famille I..... | 34 |
| 2.1.2. Les OPG de la famille II..... | 35 |
| 2.1.3. Les OPG de la famille III | 35 |
| 2.1.4. Les OPG de la famille IV..... | 36 |
| 2.2. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille I..... | 37 |
| 2.2.1. Le squelette | 37 |
| 2.2.1.1 L'opéron <i>opgGH</i> | 37 |
| 2.2.1.2. <i>opgD</i> un paralogue d' <i>opgG</i> | 42 |
| 2.2.2. La substitution | 42 |
| 2.2.2.1. La substitution par le succinate | 43 |
| 2.2.2.2. La substitution par le phosphoglycérol | 43 |
| 2.2.2.3. La substitution par la phosphoéthanolamine | 43 |
| 2.3. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille II | 45 |
| 2.4. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille III | 46 |
| 2.5. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille IV..... | 47 |
| 2.6. Phylogénie des gènes de biosynthèse des OPG | 48 |
| 2.6.1. <i>opgH</i> , <i>opgG</i> et <i>opgD</i> au sein des protéobactéries..... | 48 |
| 2.6.2. <i>ndv</i> au sein des protéobactéries | 49 |
| 2.7. Régulation de la biosynthèse des OPG | 51 |
| 2.7.1. Osmorégulation..... | 51 |
| 2.7.1.1. Régulation de l'activité enzymatique..... | 51 |
| 2.7.1.2. Régulation génétique..... | 52 |
| 2.7.2. Rétrocontrôle négatif..... | 53 |
| 2.8. OPG et interaction avec la cellule hôte | 53 |
| 2.8.1. Règne végétal | 53 |
| 2.8.2. Règne animal | 55 |
| 2.9. Rôle des OPG dans l'enveloppe bactérienne | 56 |
| 2.9.1. Phénotype pleiotrope | 56 |
| 2.9.2. Adaptation à un environnement hypo-osmotique..... | 56 |
| 2.9.3. Les OPG, un signal cellulaire ?..... | 57 |
| 3. Objectifs..... | 59 |

| | |
|---|-----|
| II Résultats et discussion..... | 62 |
| Partie I : La synthèse des OPG chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 62 |
| 1. Construction du mutant ΔopgGH_{Pa} | 62 |
| 2. Purification par chromatographie de filtration sur gel P6..... | 63 |
| 3. Analyse en spectrométrie de masse MALDI..... | 64 |
| 4. Analyse en GC-MS | 65 |
| 5. Impact des OPG sur la formation des biofilms | 68 |
| 6. Complémentation de la délétion <i>opgGH</i> | 70 |
| 7. Discussion | 72 |
| Partie II : Relation Structure-Fonction des protéines périplasmiques OpgG et OpgD..... | 76 |
| 1. Stratégie de purification et de cristallographie des protéines OpgG et OpgD | 78 |
| 1.1. Purification des protéines OpgG et OpgD | 78 |
| 1.2. Cristallographie des protéines OpgG et OpgD | 80 |
| 1.2.1. Cristallographie et détermination de la structure de la protéine OpgG | 80 |
| 1.2.2. Cristallographie de la protéine OpgD | 81 |
| 1.2.2.1. Stratégie envisagée | 81 |
| 1.2.2.2. Obtention des cristaux d'OpgD | 81 |
| 2. Détermination de la fonction d'OpgG par mutagenèse..... | 85 |
| 2.1. Fonction du domaine N terminal | 85 |
| 2.1.1. Mutagenèse localisée par PCR dégénérée | 85 |
| 2.1.1.1. Stratégie de clonages et criblage des mutants | 85 |
| 2.1.1.2. Analyse structurale des OPG des clones A27, C20 et C66..... | 89 |
| 2.1.1.3. Détermination et localisation de la ou les mutations portées par le | |
| clone A27 | 93 |
| 2.1.2. Analyse structurale et mutagenèse dirigée du domaine N terminal | |
| d'OpgG | 94 |
| 2.1.2.1. Analyse structurale | 94 |
| 2.1.2.2. Mutagenèse dirigée du domaine N terminal d'OpgG | 96 |
| 2.2. Fonction du domaine C-terminal d'OpgG | 106 |
| 2.2.1. Analyse structurale du domaine C-terminal d'OpgG | 106 |
| 2.2.2. Délétion du domaine C-terminal d'OpgG..... | 107 |
| 3. Discussion | 109 |
| 3.1. OpgG une nouvelle enzyme de branchement ? | 109 |
| 3.2. OpgG une protéine d'interaction au sein du complexe multienzymatique ? | |
| | 113 |
| 3.3. Modèle de biosynthèse des OPG, le rôle d'OpgG. | 116 |

| | |
|---|-----|
| III. Conclusions et perspectives | 120 |
| IV. Matériels et méthodes | 122 |
| 1. Souches et Milieux..... | 122 |
| 1.1. Génotype des souches et plasmides utilisés | 122 |
| 1.2. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries..... | 124 |
| 2. Techniques de génétique | 125 |
| 2.1 Préparation des cellules compétentes..... | 125 |
| 2.2 La transformation | 125 |
| 3. Techniques de biologie moléculaire..... | 126 |
| 3.1. Extraction et purification d'ADN..... | 126 |
| 3.2. Enzyme de restriction et de modification | 126 |
| 3.3. Electrophorèse | 126 |
| 3.4. Mutagenèse localisée par PCR dégénérée..... | 127 |
| 3.4.1. Stratégie de clonage | 127 |
| 3.5. Mutagenèse dirigée par PCR..... | 127 |
| 3.5.1. Stratégie de clonage | 128 |
| 3.5.1.1. Construction du mutant D146E..... | 128 |
| 3.5.1.2. Construction du mutant E147D..... | 128 |
| 3.5.1.3. Construction des mutant Y156F et R158K | 128 |
| 3.5.1.4. Construction des mutants E183D et E184D | 128 |
| 3.5.1.5. Construction du mutant D361V..... | 129 |
| 3.6. Séquençage nucléotidique..... | 129 |
| 4. Techniques Biochimiques..... | 132 |
| 4.1. Marquage radioactif des OPG | 132 |
| 4.2. Extraction des OPG..... | 132 |
| 4.3. Purification des OPG..... | 133 |
| 4.4. Désubstitution des OPG | 133 |
| 4.4.1. Elimination des liaisons ester (résidus de succinate)..... | 133 |
| 4.4.2. Elimination des liaisons phosphodiester (résidus de phosphoéthanolamine et phosphoglycérol)..... | 133 |
| 4.5. Analyse en spectrométrie de masse (MS)..... | 134 |
| 4.6. Analyse des OPG en chromatographie phase gazeuse (GC)..... | 134 |
| 4.7. Electrophorèse monodimensionnelle | 135 |
| V Bibliographie..... | 136 |
| VI. Annexe..... | 152 |

I. Introduction

1. Interaction des bactéries avec l'environnement

1.1. L'enveloppe des protéobactéries

C'est à leur surface que les cellules perçoivent les caractéristiques de l'environnement. L'enveloppe cellulaire est le reflet des stratégies adaptatives de chacun des organismes. L'enveloppe des protéobactéries comporte ainsi deux membranes, la membrane interne (ou cytoplasmique) et la membrane externe, qui délimitent un compartiment appelé périplasme (Figure I-1).

1.1.1. La membrane interne

La membrane cytoplasmique sépare le cytoplasme de l'environnement. Sa structure est proche de la membrane plasmique des eucaryotes. Elle est composée d'une double couche lipidique. La membrane interne est composée grossièrement de 50% de lipides et de 50% de protéines (Figure I-1).

1.1.1.1. La double couche lipidique

La double couche lipidique est composée de trois espèces majeures de phospholipides. 70 à 80% de phosphatidyléthanolamine (PE), 15 à 25% de phosphatidylglycérol (PG) et 5 à 10% de cardiolipides (CL). (Vanden Boom et Cronan, 1989). On peut néanmoins retrouver des petites quantités de phosphatidylsérine (PS) et d'acide phosphatidique.

Ces phospholipides sont constitués de *pn*-3-phosphoglycérol estérifié par des acides gras en position 1 et 2. Parmi ces acides gras, sont essentiellement retrouvés l'acide

palmitique (16 :0), l'acide palmitoléique (cis- $\Delta^{9,10}$ -16 :1) et l'acide cis-vaccénique (cis- $\Delta^{9,10}$ -18 :1) (Kadner, 1996).

Cette double couche lipidique constitue une barrière hydrophobe qui empêche les mouvements incontrôlés de molécules polaires et permet l'accumulation et la rétention des métabolites et des protéines.

La composition en phospholipides de la membrane cytoplasmique influence de nombreux systèmes. Elle intervient dans l'efficacité de translocation des protéines, dans la réplication du chromosome, dans la résistance aux antibiotiques, dans la motilité... Les phospholipides sont également les précurseurs de nombreux composés. Ils servent de substrat donneur pour le transfert de phosphoéthanolamine et de phosphoglycérol sur les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) de *E. coli* (Van Golde et al. 1973), de phosphoéthanolamine sur le lipopolysaccharide (Hasin et Kennedy, 1982) et de phosphoglycérol sur la lipoprotéine de Braun (Kadner, 1996).

La variation de la composition générale ou localisée des phospholipides permet de faire varier la fluidité de la membrane suivant les conditions environnementales comme la température, la présence d'ions, l'osmolarité et suivant le besoin des systèmes enzymatiques insérés dans la membrane (Kadner, 1996).

1.1.1.2. Les protéines

Plusieurs types de protéines sont retrouvées dans cette membrane interne : des protéines intégrées et des protéines transmembranaires. On retrouve plus d'une centaine de protéines différentes et leur proportion varie en fonction des conditions de croissance. De nombreuses fonctions sont assurées par cette membrane interne : la production d'énergie, le transport des nutriments et des métabolites, la translocation de macromolécules et la transduction de signaux. Certaines de ces protéines participent à la synthèse des constituants de l'enveloppe : LPS, phospholipides, peptidoglycane, exopolysaccharides ou EPS et OPG.

1.1.2. La membrane externe

La membrane externe est une spécificité de l'enveloppe des protéines à Gram négatif. C'est une barrière qui protège la cellule des agressions externes : protection contre la phagocytose par l'abondance des charges négatives, exclusion de composés hydrophobes et de composés de haut poids moléculaire, protection contre des changements brutaux de pression osmotique dans le milieu extérieur. Elle permet la diffusion de solutés de petites tailles dont la masse moléculaire est inférieure à 650 Da. Elle est constituée d'une double couche lipidique bien particulière caractérisée par la présence dans le feuillet externe du lipopolysaccharide (LPS) (Figure I-1).

1.1.2.1. La double couche lipidique

Les deux feuillets formant la double couche lipidique ont une composition totalement différente.

Le feuillet interne est constitué exclusivement de phospholipides similaires à la membrane cytoplasmique. On retrouve la phosphoéthanolamine PE, le phosphoglycérol PG et les cardiolipides CL. La proportion en PE est plus importante.

Le feuillet externe est caractérisé par la présence d'un élément essentiel : le lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est composé de trois parties : le lipide A à caractère hydrophobe, le noyau et l'antigène O (Figure I-1).

Le lipide A est formé de deux résidus de glucosamine liés en β -1,6, lesquels sont substitués par six à sept acides gras, la plus part saturés et hydroxylés. Cette chaîne de résidus de glucosamine est également substituée par des groupements chargés comme des résidus de phosphate et du 4-aminoarabinose apportant un caractère fortement anionique. Ce lipide A représente la structure minimale qui forme ce feuillet externe et est donc indispensable à l'assemblage des LPS dans la membrane externe. Le lipide A constitue le pouvoir endotoxique du LPS. A petite concentration, il provoque la fièvre et active une série d'événements immunologiques déclenchant

les mécanismes de défenses de l'hôte. A forte concentration, il peut provoquer un état de choc et la mort.

Le noyau est un hétéro-oligosaccharide qui peut être divisé en une partie interne et une partie externe. Le noyau interne est très conservé chez les différentes espèces et est constitué de sucres spécifiques des LPS : trois molécules d'heptose (le L-glycéro-D-mannoheptose), trois molécules d'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique (KDO). Ce noyau interne est également caractérisé par une charge anionique apportée par la présence de résidus phosphate, pyrophosphate, 2-aminoéthylphosphate et 2-aminoéthylpyrophosphate. Cette grande concentration de charges négatives a un rôle physiologique et permet la concentration de cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} nécessaire à l'intégralité structurale et fonctionnelle de la membrane externe. Le noyau externe a une architecture plus diversifiée selon les espèces bactériennes. Il est en général composé de 5 hexoses parmi lesquels on retrouve le D-glucose, le D-galactose et la N-acetyl-D-glucosamine.

L'antigène O est un polymère constitué par la répétition d'un oligosaccharide de un à 8 résidus. La structure de l'unité de répétition diffère d'une souche à l'autre. Cette partie comme son nom l'indique est antigénique. Elle existe sous des formes très variées et est utilisée en microbiologie pour définir certaines espèces et sous espèces (Rietschel al. 1994).

Les différents constituants du LPS sont synthétisés au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique. L'antigène O est transporté à travers la membrane interne séparément de la partie noyau-lipide A. La ligation de l'antigène O sur cette partie s'effectue dans le périplasme (Bos et Tommassen, 2004)

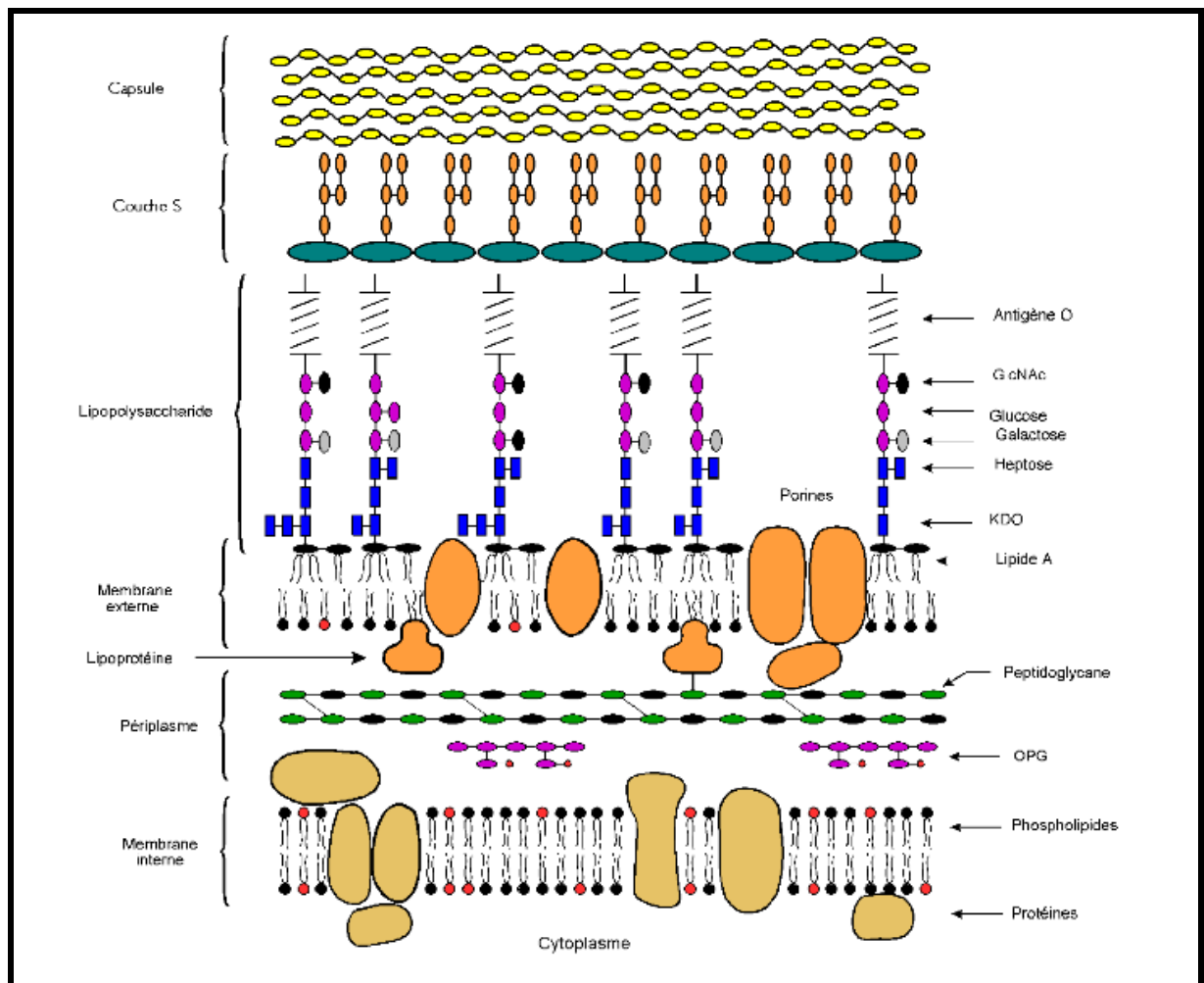


Figure I-1 : Schéma de l'enveloppe et des couches associées chez les Protéobactéries d'après Raetz (1986).

1.1.2.2. Les protéines de la membrane externe

Les protéines de la membrane externe (Outer Membrane Proteins ou OMP) sont très différentes de celles de la membrane interne, tant sur la nature que sur la fonction. On retrouve les lipoprotéines qui sont ancrées dans la membrane grâce à un lipide en N-terminal et les protéines transmembranaires, des protéines amphipatiques qui adoptent une structure tridimensionnelle particulière : des feuillets β organisés en tonneaux β avec les résidus hydrophobes pointés vers l'intérieur de la couche lipidique (Bos et Tommassen, 2004).

Dans cette membrane externe, on retrouve de nombreuses porines. Ces protéines forment des pores ou canaux relativement peu spécifiques permettant le passage de petites molécules hydrophiles, y compris les antibiotiques. Nombre de ces protéines servent aussi de récepteurs à des phages ou à des toxines bactériennes (bactériocines).

Chez *Escherichia coli*, les porines majeures OmpF et OmpC sont organisées en trimères. Chaque monomère forme un tonneau β constitué de 13 feuillets β . Chacune des sous unités constitue un canal ouvert qui permet la diffusion facilitée de composés hydrophiles (acides aminés, certains ions, des sucres) dont la masse moléculaire est inférieure à 650 Da. Ces porines sont fortement chargées à chacune de leurs extrémités et excluent ainsi les composés hydrophobes. L'expression des porines OmpF et OmpC est régulée par l'osmolarité du milieu extérieur (Nikaido, 1996).

OmpA, une protéine monomérique abondante de la membrane externe de *E. coli* est également capable de former des canaux dont le diamètre approche ceux constitués par la protéine OmpF. Par contre la pénétration des molécules à travers OmpA est beaucoup plus faible. Il apparaît que OmpA ne participe pas réellement à la diffusion des molécules puisqu'elle adopte le plus souvent une conformation fermée. Elle aurait plutôt un rôle de structuration de la membrane externe (Nikaido, 1996).

Chez *P. aeruginosa*, on retrouve OprF, une protéine majeure de la membrane externe. Cette protéine adopte deux conformations. OprF forme dans 95% des cas un canal fermé dont l'organisation structurale ressemble à la protéine OmpA de *E. coli* : le domaine N-terminal constitué de 8 feuillets β et le domaine C-terminal périplasmique globulaire composé d'hélices α . Plus rarement, OprF forme un canal ouvert qui permet la diffusion facilitée de petites molécules. Le canal est alors constitué de 16 feuillets β formant un tonneau β de diamètre très proche de OmpF de *E. coli*. La participation de OprF à la diffusion des petites molécules à travers la membrane externe est très limitée. OprF comme OmpA aurait un rôle de structuration de la membrane externe (Sugawara et al. 2006).

Certains composés hydrophiles peuvent être nécessaires à la survie de la cellule mais leur taille ne permet pas leur diffusion à travers les porines de la membrane externe. Elles devront emprunter des canaux spécifiques. C'est le cas de la protéine LamB de *E. coli* qui adopte une structure trimérique permettant la diffusion facilitée du maltose et des maltodextrines. Un autre exemple, la protéine ScrY qui constitue un canal spécifique du saccharose (Nikaido, 1996). Chez *P. aeruginosa*, OprD facilite la diffusion d'acides aminés basiques (Tamber et al. 2006).

Il existe des récepteurs dits à haute affinité qui diffèrent des canaux spécifiques. Ces récepteurs sont capables de capter des molécules présentes dans le milieu à très faible concentration. La constante de dissociation est de l'ordre du μM voire du nM. La fixation du ligand engendre un changement de conformation du récepteur. La translocation des molécules à travers la membrane externe nécessite la participation d'une protéine ancrée dans la membrane interne TonB et l'utilisation de la force proton-motrice de la membrane interne comme source d'énergie. C'est le cas, chez *E. coli* de BtuB, récepteur de la vitamine B12 ou encore FhuA nécessaire au transport du fer (Nikaido, 1996).

E. coli possède dans son enveloppe environ 90 types de lipoprotéines dont la majorité sont ancrées dans la membrane externe (Narita et Tokida, 2006). La plus connue, la lipoprotéine de Braun, est une protéine de faible poids moléculaire (7200 kDa) qui existe en très grand nombre de copies dans la cellule. La cystéine en N-terminal est substituée par un groupement diacylglycérol sur le groupe thiol et par un acide gras sur le groupement amine. Ces trois acides gras permettent son ancrage dans le feuillet interne de la membrane externe. Près d'un tiers de ces protéines sont liées de façon covalente avec le peptidoglycane par leur extrémité C-terminal périplasmique et donne une stabilité à la membrane externe (Nikaido, 1996).

1.1.3. Le périplasme

Le périplasme représente un compartiment à part entière des bactéries à Gram négatif (Figure I-1). Il est situé entre les deux membranes de l'enveloppe cellulaire. Le périplasme prend l'aspect d'un gel visqueux, on y retrouve des composés

spécifiques comme la muréine, certaines protéines et des oligosaccharides. Le compartiment périplasmique représente un tampon entre l'environnement extérieur et l'intérieur de la cellule. Les composants du périplasme jouent un rôle important dans la coordination des systèmes qui régulent la physiologie des protéobactéries. Les protéines périplasmiques accomplissent des fonctions dans la détection, la dégradation et le transport de nutriments à travers la cellule. Les protéines résidentes du périplasme interviennent également dans la biogenèse de différentes protéines, elles participent aussi à la synthèse du peptidoglycane, de composés lipidiques ou glucidiques de la membrane externe...Le périplasme est régulé pour adapter la bactérie aux changements de milieu qui l'entourent.

1.1.3.1. Structure et physiologie du périplasme

Il apparaît que le périplasme a un volume non négligeable. Plusieurs approches ont été utilisées pour estimer le volume périplasmique. La technique de microscopie électronique utilisant des méthodes de cryofixation a permis d'évaluer l'épaisseur du périplasme. Celle-ci est comprise entre 13 et 25 nm soit 8 à 16% du volume de la cellule (Graham et al. 1991). Cette variation de volume est liée aux contractions du périplasme en réponse aux changements d'osmolarité du milieu extérieur et à la préparation des cellules analysées en microscopie. D'autres approches basées sur l'utilisation de composés radioactifs ayant des propriétés de diffusion différente à travers l'enveloppe des bactéries ont été utilisées. Le volume périplasmique a alors été estimé entre 20 et 40% du volume cellulaire (Cayley et al. 2000).

A l'intérieur de cet espace, la couche de peptidoglycane encore appelée muréine est en association étroite avec la membrane externe et elle occupe une épaisseur de 5 à 8 nm. Ce peptidoglycane possède un état de polymérisation variable et est associé à une solution aqueuse de protéines, d'oligosaccharides. Le périplasme apparaît comme un gel visqueux (Hobot et al. 1984) dans lequel les protéines périplasmiques diffusent très lentement.

Les bactéries maintiennent une pression osmotique supérieure au milieu extérieur. Cette différence est appelée pression de turgescence. *E. coli* supporte une très large

gamme d'osmolarité pour sa croissance allant de 0,015 osM à 3 osM. Ceci implique une régulation rigoureuse. Le périplasme et le cytoplasme sont isoosmotiques. En effet la membrane interne ne supporte pas de contraintes mécaniques (Stock et al. 1997), c'est le peptidoglycane qui supporte ce stress. Les changements d'osmolarité influent très peu sur le volume périplasmique. Il existe des mécanismes qui équilibrent l'osmolarité des deux compartiments. A haute osmolarité, la cellule est confrontée à une perte d'eau et à l'abolition de la pression de turgescence. Sous ces conditions, l'importation d'ions potassium et aussi la synthèse de solutés comme la glycine, la bétaine, la proline et le tréhalose vont augmenter l'osmolarité du cytoplasme. Lors du passage à basse osmolarité, le volume du périplasme aurait tendance à diminuer sauf si celui-ci est incompressible ou si des solutés non diffusibles à travers la membrane externe tels que les glucanes périplasmiques osmorégulés sont synthétisés dans le périplasme (Oliver et al. 1996).

Il existe des zones d'adhésion, estimés entre 200 et 400, entre la membrane interne et la membrane externe. Celles-ci ont été mises en évidence chez *E. coli* par microscopie électronique après plasmolyse des cellules (Bayer 1968 et 1979). Les jonctions de Bayer ne sont observées que pendant la phase exponentielle de croissance, elles auraient donc un rôle dans la biogenèse de l'enveloppe. Il a été proposé que ces zones correspondent au lieu de croissance du peptidoglycane encore lié de manière covalente au bactoprénolpyrophosphate. Ces sites d'adhésion pourraient être également le lieu de transport des molécules destinées à la membrane externe. Ils 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 al. 1994).

1.1.3.2. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane ou saccule de muréine constitue la paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif, il représente 10% du poids sec de la cellule et atteint une épaisseur maximale de 8 nm. Il forme une enveloppe rigide qui assure l'intégrité de membrane cytoplasmique et qui est responsable de la forme des cellules. Le

peptidoglycane représente une structure dynamique qui intervient dans l'élongation et la division cellulaire (Holtje, 1998).

La partie glycane est constituée de chaînes linéaires de longueur variable où alternent la *N*-acétylglucosamine (GlcNac) et l'acide *N*-acétylmuramique (MurNac) liés en β -1,4. Ces chaînes glycaniques sont reliées entre elles de manière covalente par des térapeptides constitués chez *E. coli* de L-alanine (L-Ala), d'acide D-glutamique (D-Glu), d'acide meso-diaminopimélique (DAP) et de D-alanine (D-Ala). Ces unités térapeptidiques, L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala, sont liées de manière covalente par une liaison amide générée par la fonction amine de la L-alanine et la fonction acide carboxylique de l'acide *N*-acétylmuramique. Les unités térapeptidiques sont reliées entre elles par une liaison amide entre la D-Ala d'un peptide et le DAP du peptide de l'enchaînement voisin. Dans 20% des cas, cette liaison relie deux DAP (Park, 1996). Selon les espèces, il existe des variations importantes au niveau de la composition des peptides, de la nature et du degré de branchement.

La synthèse des unités muropeptidiques s'effectue dans le cytoplasme en association avec la membrane interne (Figure I-2). Chez *E. coli*, les premières étapes conduisent à la synthèse d'un précurseur UDP-MurNac-pentapeptide (L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala). L'addition de chacun de ces résidus nécessite une ligase spécifique de l'acide aminé et l'hydrolyse d'ATP. L'UDP-MurNac-pentapeptide est alors transféré par une translocase membranaire sur l'accepteur membranaire l'undecaprenyl phosphate (bactoprenylphosphate) pour former le lipide I. Une glycosyltransférase de la membrane interne permet d'ajouter un résidu de GlcNac pour former le lipide II : GlcNac-MurNac-(pentapeptidyl)-pyrophosphoryl undecaprenol. Celui-ci est alors transféré du côté périplasmique de la membrane interne. Les unités sont transférées sur les extrémités non réductrices du peptidoglycane existant par des réactions de transglycosilation. Les liaisons interchaînes s'effectuent par des réactions de transpeptidation qui impliquent l'hydrolyse des liaisons D-Ala-D-Ala (Figure 1-3) (Holtje, 1998).

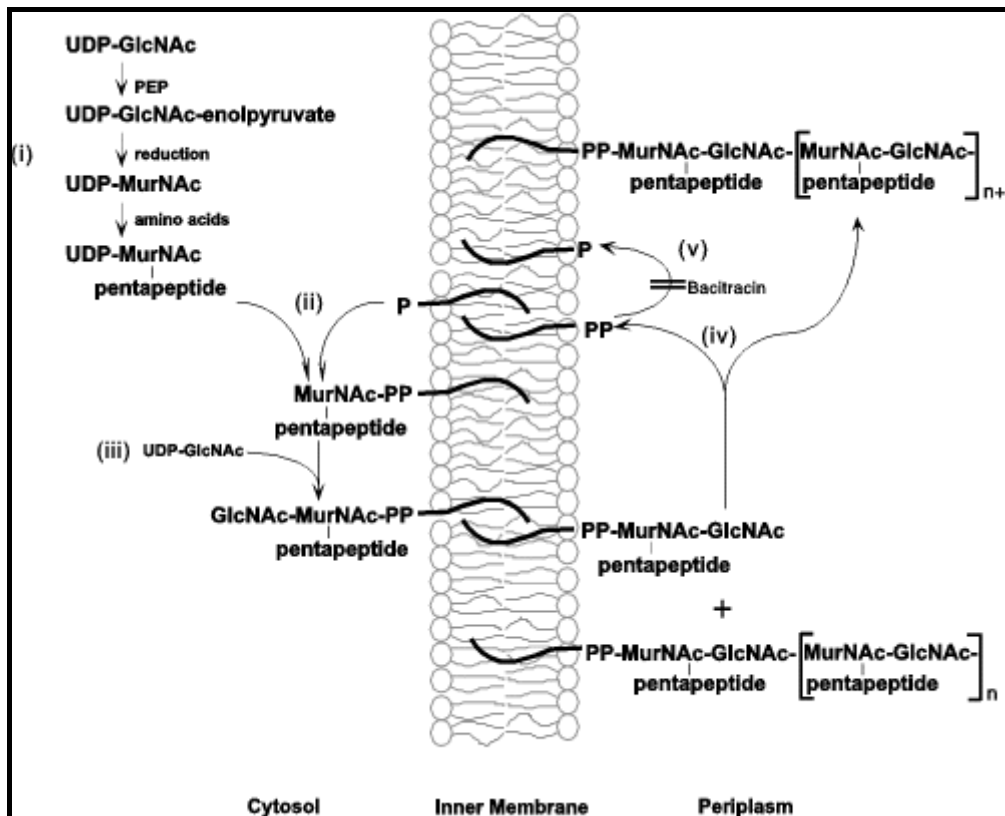


Figure I-2 : Biosynthèse du peptidoglycane (Holtje et al. 1998)

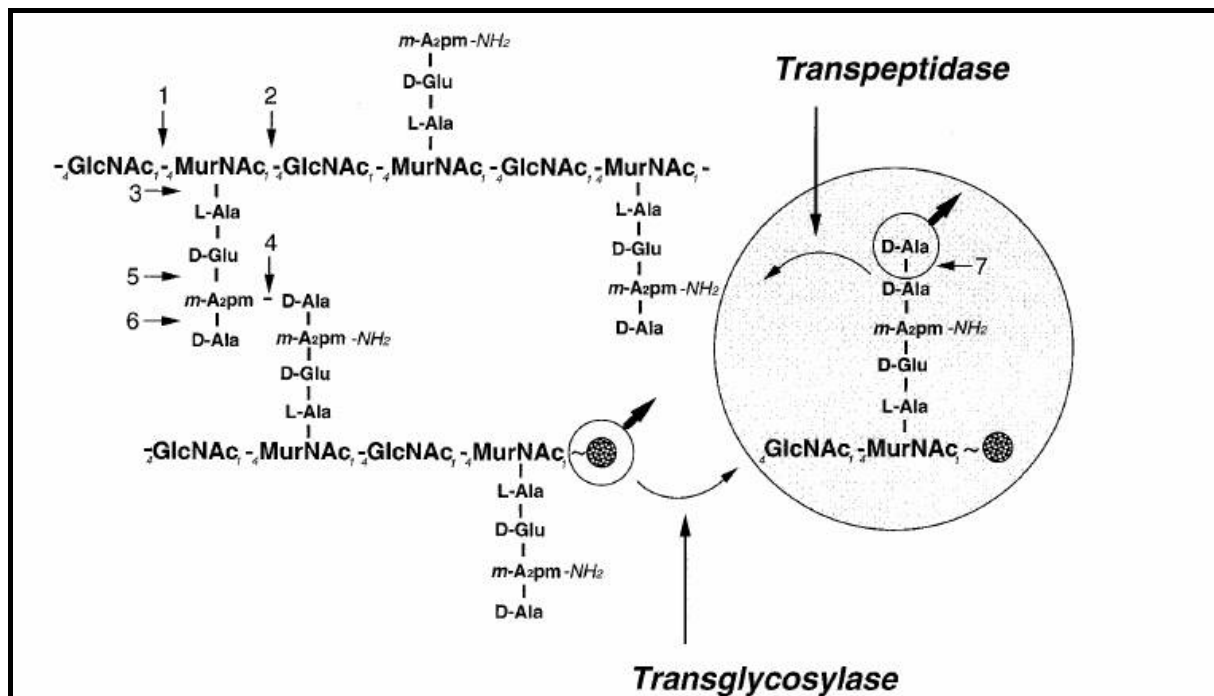


Figure II-3 : Structure du peptidoglycane chez *E. coli*. Dans le cercle est représentée la molécule précurseur reliée au bactoprénol. Celle-ci peut-être reliée au niveau du résidu de l'acide muranique par l'activité de la transglycosidase ou de l'alanine par l'activité de la transpeptidase (Holtje et al. 1998).

1.1.3.3. Les protéines périplasmiques

Les protéines périplasmiques peuvent être classées selon leur fonction (Oliver, 1996).

Les protéines affines périplasmiques interviennent dans la détection et facilitent le transport de petites molécules comme des ions, des sucres, des acides aminés ou encore des vitamines.

Les enzymes cataboliques ont pour fonction de dégrader les molécules qui ont pu traverser la membrane externe et qui ne peuvent pas être transportées à travers la membrane interne. On y retrouve des phosphatases, des nucléases et des protéases.

Les enzymes de détoxification inactivent les composés toxiques ayant traversés la membrane externe soit en les détruisant soit en modifiant leur structure. C'est le cas par exemple des β -lactamases qui agissent sur la pénicilline et les céphalosporines.

Les protéines qui interviennent dans la biogenèse de l'enveloppe participent à la mise en conformation des protéines. On retrouve : des disulfure oxydoréductase (DsbA et DsbC) qui participent à la formation des ponts disulfures ; des peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase ; des protéines chaperons.

Certaines protéines participent à la biosynthèse et/ou à l'exportation d'exopolysaccharides, du peptidoglycane, de protéines sécrétées ou encore des OPG.

Le système Tol-Pal est un ensemble de protéines impliquées dans la stabilité de l'enveloppe et l'entrée de certaines colicines. Ce système permettrait le passage de composants de la membrane externe nécessitant l'utilisation d'une source d'énergie (Lazzaroni, 1999).

1.1.3.4 Les glucanes périplasmiques osmorégulés

Des glucanes sont présents dans le périplasme des protéobactéries. Ils sont en quantité variable et cette quantité dépend de l'osmolarité du milieu de croissance des bactéries d'où leur nom de glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG). Ces glucanes faisant l'objet de ce travail, ils seront décrits ultérieurement de façon plus complète.

1.1.4. Les structures associées à la membrane externe

En association avec cette membrane externe, on retrouve des exopolysaccharides de hauts poids moléculaires qui forment une capsule au niveau du LPS (Figure I-1). Ces exopolysaccharides représentent des déterminant antigéniques, c'est le cas des antigènes K et antigène M (acide colanique) chez *E. coli*. La capsule ne joue pas un rôle vital pour la bactérie. Par contre, elle a une fonction importante dans le pouvoir pathogène puisqu'elle permet l'adhérence à des niches particulières. Elle s'oppose aussi à la phagocytose et à l'activation de la voie alterne du système du complément.

La couche S, constituée de protéines et de glycoprotéines, forme une zone cristalline dans un système géométrique, oblique ou hexagonal (Figure I-1). Elle représente une pellicule de 5 à 25 nm d'épaisseur qui pourrait participer à l'adhésion des bactéries sur la cellule hôte. Elle pourrait avoir également un rôle protecteur (Sara et al. 2000).

Les flagelles sont des appendices qui sortent à l'extérieur de l'enveloppe et même au-delà de la capsule. Ils ont un rôle important dans la motilité des bactéries. On retrouve aussi des pilis qui interviennent dans l'adhésion des bactéries sur un support.

Ces éléments seront détaillés dans le chapitre consacré à *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2. Interaction avec l'hôte

L'exemple de *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1. Présentation et implication clinique de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bâtonnet à Gram négatif, mobile. Il s'agit d'une chimiohétérotrophe aérobie qui utilise l'oxygène O₂ comme accepteur d'électrons. *P. aeruginosa* a un cycle des acides tricarboxyliques fonctionnels, oxyde des substrats en CO₂. Cette bactérie dégrade préférentiellement les hexoses par la voie d'Etner-Doudoroff plutôt que par la glycolyse. *P. aeruginosa* vit à l'état saprophytique dans l'eau (eau douce ou eau de mer), le sol humide et sur les végétaux. Elle possède un métabolisme très versatile qui lui permet d'utiliser une grande variété de composés : des déchets toxiques, plusieurs sources de carbone et du nitrate comme accepteurs d'électrons.

Elle a une grande capacité d'adaptation à un environnement hostile et est capable de développer de nombreux facteurs de virulence lui permettant d'infecter plusieurs types d'hôtes : une plante, un animal ou encore un insecte. C'est une bactérie pathogène opportuniste chez l'homme responsable d'un taux élevé de mortalité. Elle est la cause d'infections d'origine nosocomiale de type respiratoire et urinaire. Elle se développe essentiellement au sein des organismes immunodéprimés (leucémie, cancer, SIDA). Ce pathogène est également responsable de méningites, dermatites, septicémies...

P. aeruginosa est responsable d'infections chroniques pulmonaires sous la forme de biofilm chez les personnes atteintes de fibroses kystiques (mucoviscidose). Cette maladie héréditaire, à caractère récessif, est causée par de multiples mutations dans le gène codant la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Les mutations engendrent une mauvaise localisation, ou bien souvent, un mauvais repliement de ce canal transmembranaire. Il en résulte un transport défectueux des

ions chlorures à travers la surface épithéliale cellulaire. Un mucus visqueux déshydraté tapisse alors les parois pulmonaires entravant ainsi une fonction vitale, la respiration. La capacité des cils respiratoires à éliminer les particules emprisonnées est diminuée. De nombreux pathogènes, et majoritairement *P. aeruginosa*, ont alors le temps nécessaire pour s'implanter dans les voies respiratoires (Boucher et al, 2004). L'expression de multiples facteurs de virulence comme des pilis de type IV, des flagelles, des exotoxines, le LPS ou encore des protéines composant le système de sécrétion de type III augmentent à long terme l'association entre *P. aeruginosa* et les poumons des personnes atteintes de mucoviscidose. De plus la transition du biofilm non muqueux à un biofilm muqueux favorise une meilleure résistance aux traitements antibiotiques et accélère le déclin des voies pulmonaires (Ramsey et al. 2005).

1.2.2. Les voies de sécrétions et les facteurs de virulence externes

P. aeruginosa va sécréter un grand nombre de protéines dont des facteurs de virulence dans le milieu extérieur. Ces protéines sont synthétisées dans le cytoplasme et elles devront traverser les deux membranes de l'enveloppe cellulaire.

1.2.2.1. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (SST1) permet de sécréter la protéine en une seule étape. Il est constitué de trois protéines membranaires. Chez *P. aeruginosa*, on retrouve une translocase AprD de la membrane interne appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) qui fournira l'énergie nécessaire au transport des protéines par hydrolyse d'une molécule d'ATP. AprE, protéine ancrée dans la membrane interne, membre de la famille MFP (Membrane fusion protein) permet d'établir la connexion entre les deux membranes de l'enveloppe. Enfin le troisième composant, AprF forme un pore à travers la membrane externe (Kostakioti et al. 2005) (Figure I-4).

Ce système de sécrétion participe à l'exportation de facteurs de virulence. Les substrats majeurs sont une protéase alcaline AprA qui dégrade efficacement les composants du complément C1q et C3 ainsi que l'interféron γ et le facteur de nécrose tumorale TNF α . La protéine HasA utilise aussi ce type de sécrétion. Elle est nécessaire pour l'utilisation du fer de l'hémoglobine de l'hôte par *P. aeruginosa*. HasA est une sidérophore captant le fer de l'hémoglobine et le transportant à un récepteur de surface spécifique, HasR (Ma et al. 2003).

1.2.2.2. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type II

Le transport des protéines par le système de sécrétion de type II (SST2), encore appelé voie de sécrétion générale, s'effectue en deux étapes (Figure I-4).

La première étape correspond au transport à travers la membrane interne de la protéine non conformée. La protéine est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur possédant un peptide signal en N terminal. Ce précurseur est ciblé et transloqué à travers la membrane interne grâce à la machinerie Sec. Le peptide signal est alors clivé par la signal-peptidase et la protéine est relarguée dans le périplasme puis mis en conformation par de nombreuses protéines chaperons. Les métalloprotéines utiliseront de préférence un autre système pour traverser cette membrane interne. Le système TAT (Twin Arginin Translocation) permet la translocation de protéines déjà conformées dans le cytoplasme.

La deuxième étape correspond à l'exportation de la protéine conformée dans le milieu extérieur via les systèmes Xcp et HxC de la famille des GSP (General Secretory Pathway). De très grandes similitudes sont retrouvées avec les protéines composant le système d'assemblage des pilis de type IV.

Divers facteurs de virulence empruntent cette voie de sécrétion parmi lesquels on retrouve des protéases, des lipases ou encore la phospholipase C qui possède une activité hémolytique (Ball et al. 2002). LasB plus connue sous le nom d'élastase, une

métalloprotéine dépendante du zinc, est responsable de la dégradation de l'élastine et du collagène, protéine importante de l'élasticité des tissus pulmonaires. Elle est également capable d'inactiver certains composants importants à l'initiation et à la modulation de la réponse inflammatoire. Elle contribue ainsi à la protéolyse des immunoglobulines IgG humaines et de certains composants du système du complément (Heck et al. 1986).

La staphylolysine LasA est une métalloendopeptidase qui clive les liaisons peptidiques Gly-Gly des peptides et des protéines. Elle facilite ainsi l'action de l'élastase (Kessler et al. 1997).

L'exotoxine A agit d'une manière comparable à la toxine diphtérique. Elle inhibe la synthèse protéique des cellules eucaryotes par ADP-ribosylation du facteur d'élongation EF2 bloquant ainsi la synthèse protéique (Kipsis et al. 2006).

1.2.2.3. Les facteurs de virulence empruntant le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (SST3) est activé dès le contact avec la cellule eucaryote et permet une translocation directe des protéines du cytoplasme vers le cytosol de la cellule hôte. Il est composé de deux parties : l'appareil de sécrétion en lui-même et l'appareil de translocation encore appelé « aiguille » qui s'insère dans la membrane des cellules cibles et qui permet l'injection des effecteurs toxiques (Figure I-4).

Quatre exotoxines, ayant un rôle majeur dans l'infection pulmonaire, sont sécrétées par ce système chez *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoY et ExoU.

ExoS et ExoT sont des protéines bifonctionnelles. Le domaine N-terminal possède une activité GAP (GTPase-activating protein) spécifique des petites protéines G de la famille Rho. Le domaine C-terminal a une activité d'ADP ribosyltransférase et agit sur les protéines Ras dans le cas de ExoS et sur les protéines CrkI et CrkII dans le cas de ExoT. Leur activité perturbent les voies de signalisation cellulaire médiées par

Ras et Crk I/II. Il en résulte une mort cellulaire ou une inhibition de la phagocytose (Shaver et al. 2006).

ExoU possède une activité phospholipase A2 et est associée à une rapide lyse des cellules eucaryotes (Shaver et al. 2006). Cette protéine détruit les membranes cellulaires induisant la perméabilité des cellules épithéliales, des macrophages et des fibroblastes. ExoY est une adénylate cyclase induisant une augmentation du taux d'AMPc de la cellule hôte. (Yahr et al. 1998).

1.2.3. Les facteurs de virulence associés à la bactérie

1.2.3.1. Le flagelle

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui lui permet le phénomène de nage (swimming) dans un environnement liquide ou semi liquide (agar < 0,4%). Ce flagelle participe également à la motilité de type tortillement (swarming) qui permet le déplacement des bactéries sur des surfaces semi-solides (0,4% < agar < 1%) (Köhler et al. 2000). Le flagelle est organisé en trois parties : le filament hélicoïdal de 5 à 10 µm est constitué de l'association d'une seule protéine : la flagelline. Ce filament est relié au corps basal par une jonction courbe nommée le crochet. Le corps basal, ancré solidement dans l'enveloppe bactérienne, constitue le moteur du flagelle. La force proton-motrice produit un gradient électrochimique de proton de part et d'autre de la membrane fournissant ainsi l'énergie nécessaire au mouvement de rotation du flagelle (Figure I-4). Les flagelles participent aux étapes initiales de l'infection pulmonaire et plus précisément à l'initiation des biofilms (Sadikot et al. 2005).

1.2.3.2. Les pilis de type IV

Les pilis de type IV sont de fins filaments localisés aux pôles de la cellule et sont constitués par la répétition de monomère de piline PilA (Figure I-4). La polymérisation et dépolymérisation de ces sous unités favorisent l'extension ou la rétraction de cette structure permettant le phénomène de trépidation (twitching) (Mattick, 2002). La bactérie peut alors se déplacer sur des surfaces solides. Ces pilis de type IV participe également à la motilité de type tortillement (swarming) (Köhler et

al. 2000). Ils ont un rôle important dans l'attachement aux cellules épithéliales et dans la formation des biofilms.

1.2.3.3. Le LPS

Le LPS de *P. aeruginosa* a un rôle critique dans la virulence. Il est reconnu par de nombreux récepteurs de la cellule hôte parmi lesquels on retrouve la famille des récepteurs TLR (Toll like receptor) mais également CFTR (Kipnis et al. 2006).

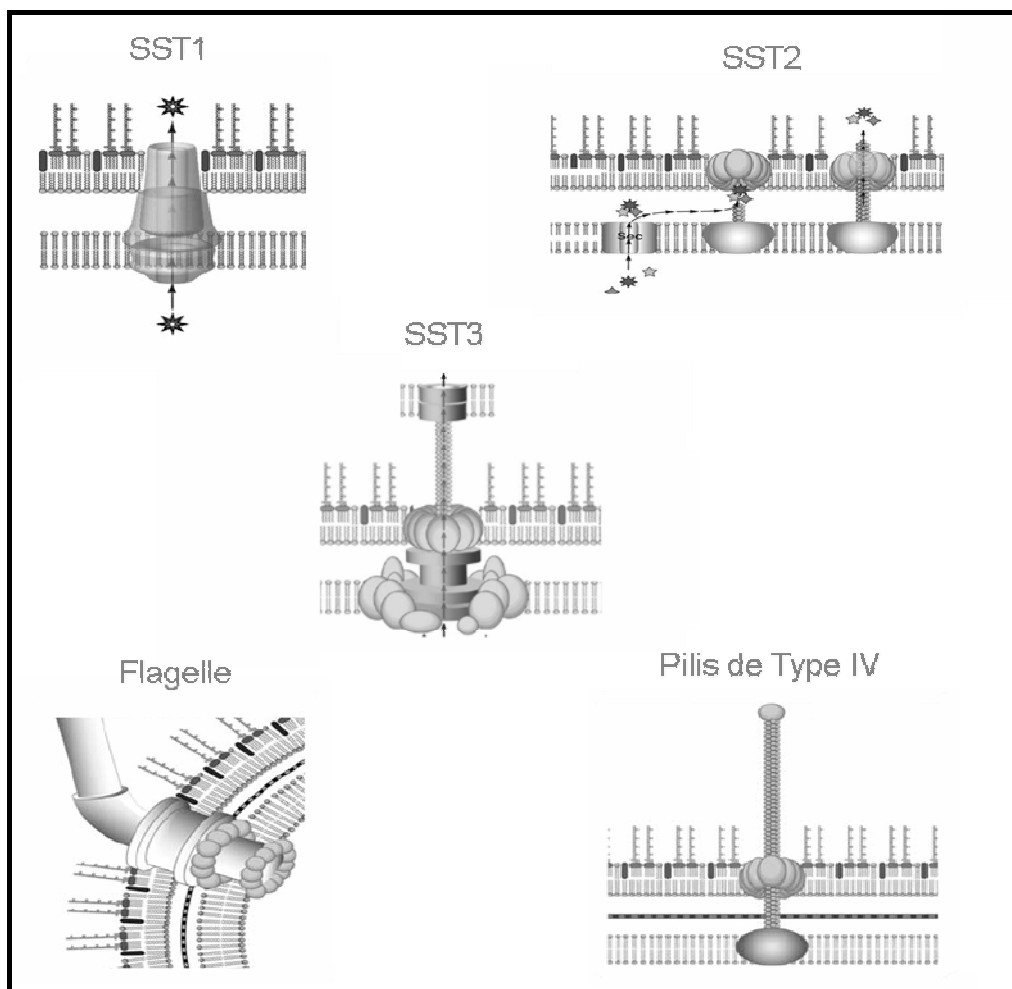


Figure I-4 : Systèmes de sécrétion et facteurs de virulence associées à *P. aeruginosa* (Kipnis et al. 2006).

1.2.4. Les biofilms

Les biofilms ont fait l'objet de nombreuses études chez *P. aeruginosa*. Ils constituent un modèle de protection, de survie dans un environnement hostile. La matrice extracellulaire du biofilm est généralement composée de polysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines. Il s'agit d'une structure organisée constituée de microcolonies, séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation acheminant l'oxygène, les nutriments et évacuant les déchets. Les cellules sont différenciées et ne présentent pas toutes le même niveau d'expression des gènes. Certaines sont plus impliquées dans la nutrition alors que d'autres expriment des gènes de virulence et sont capables de résister aux agents antimicrobiens et aux bactériophages (Costerton et al., 1999).

Ces biofilms sont très résistants aux antibiotiques : les cellules bactériennes évoluent dans un environnement pauvre en nutriment et leur croissance est ralentie, rendant moins efficace l'action des antibiotiques. De plus, de nombreuses pompes à efflux sont exprimées. La présence de la matrice constituée d'exopolysaccharides ralentit la pénétration de ces molécules toxiques, l'alginate capture le peroxyde d'oxygène, les radicaux libres relargués par les macrophages (Costerton et al., 1999).

Les biofilms représentent une densité cellulaire accrue et sont ainsi étroitement liés à l'activation de systèmes détecteurs de quorum impliqués dans l'expression de nombreux facteurs de virulence décrits précédemment.

1.2.4.1. Formation des biofilms

1.2.4.1.1. De l'attachement réversible à l'attachement irréversible

La motilité joue un rôle important dans la formation des biofilms. Les cellules à l'état planctonique expriment les gènes *flk* permettant la synthèse de flagelles et le phénomène de nage en milieu liquide. Ils permettent la fixation réversible des bactéries sur la surface solide. Plusieurs cellules adhèrent au support et forment une monocouche. Chez *P. aeruginosa*, *CupA* aurait un rôle dans l'assemblage d'une

adhésine de type pili, permettant également cette phase d'attachement sur le support. Cette phase d'attachement réversible permet aux bactéries de choisir un endroit approprié pour la formation du biofilm. L'attachement devient alors irréversible (Figure I-5).

Pendant cette étape, la motilité cesse. Le système détecteur de quorum LasI/LasR devient actif. LasI est une auto-inducteur synthase produisant une acylhomosérine lactone (AHL), la *N*-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL), molécule signal excrétée dans le milieu extérieur. Lorsque la concentration en auto-inducteur atteint un seuil critique, témoin d'une densité bactérienne accrue, une molécule d'AHL se lie à deux protéines régulatrices LasR pour constituer un complexe activateur de transcription de gènes de virulence comme *lasB* et *lasA* codant des élastases, *xcp* intervenant dans le système de sécrétion de type II, *aprA* codant une protéase alcaline, *exoA* codant l'exotoxine A intervenant dans la destruction des tissus pulmonaires et *lasI*. (Ruimy et Andremont, 2004) (Figure I-6).

1.2.4.1.2. Des microcolonies aux macrocolonies

Les cellules bactériennes vont ensuite former des microcolonies d'une épaisseur de 10µm. Au cours de cette première étape de maturation, les pilis de type IV sont exprimés. L'assemblage/désassemblage de la sous unité PilA provoque le mécanisme extension/rétention de ces pilis (trépidation) nécessaire à la formation de ces microcolonies (Figure I-5).

Un deuxième système activateur de quorum est activé par LasI/LasR, RhII/RhIR qui fonctionne de la même façon que celui décrit précédemment, à la différence que l'auto-inducteur est la *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4 HSL), exprime également des gènes de virulence et le gène *rpoS* et intervient dans la synthèse de rhamnolipides (Figure I-6). Les cellules continuent à se diviser et forment des macrocolonies en forme de champignon, (mushroom), d'une épaisseur moyenne de 100µm. Le biofilm est alors mature, il est entouré d'une épaisse couche d'exopolysaccharides (Figure I-5).

1.2.4.1.3. Maintenance et dispersion

Le facteur sigma RpoS et les rhamnolipides ont un rôle dans la maintenance du biofilm. La cascade RpoS va restreindre la croissance des biofilms. Les rhamnolipides ont un rôle de surfactant, ils vont interrompre les interactions cellules-cellules et cellules-support évitant un développement trop important du biofilm. Les bactéries sont alors capables de se détacher du biofilm pour aller coloniser d'autres surfaces (Davey et al. 2003) (Figure I-5).

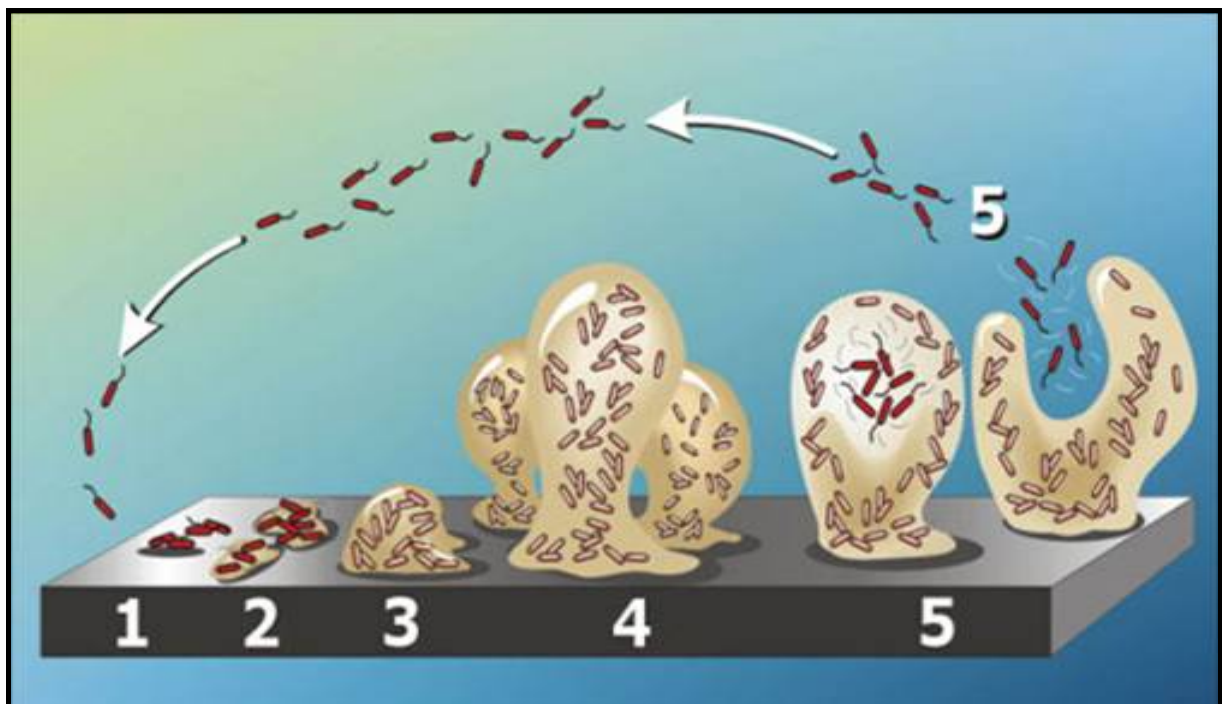


Figure I-5 : Les différentes étapes de la formation des biofilms. 1, adhésion réversible ; 2, adhésion irréversible ; 3, maturation 1 ; 4, maturation 2 ; 5, dispersion (Stoodley et al. 2002).

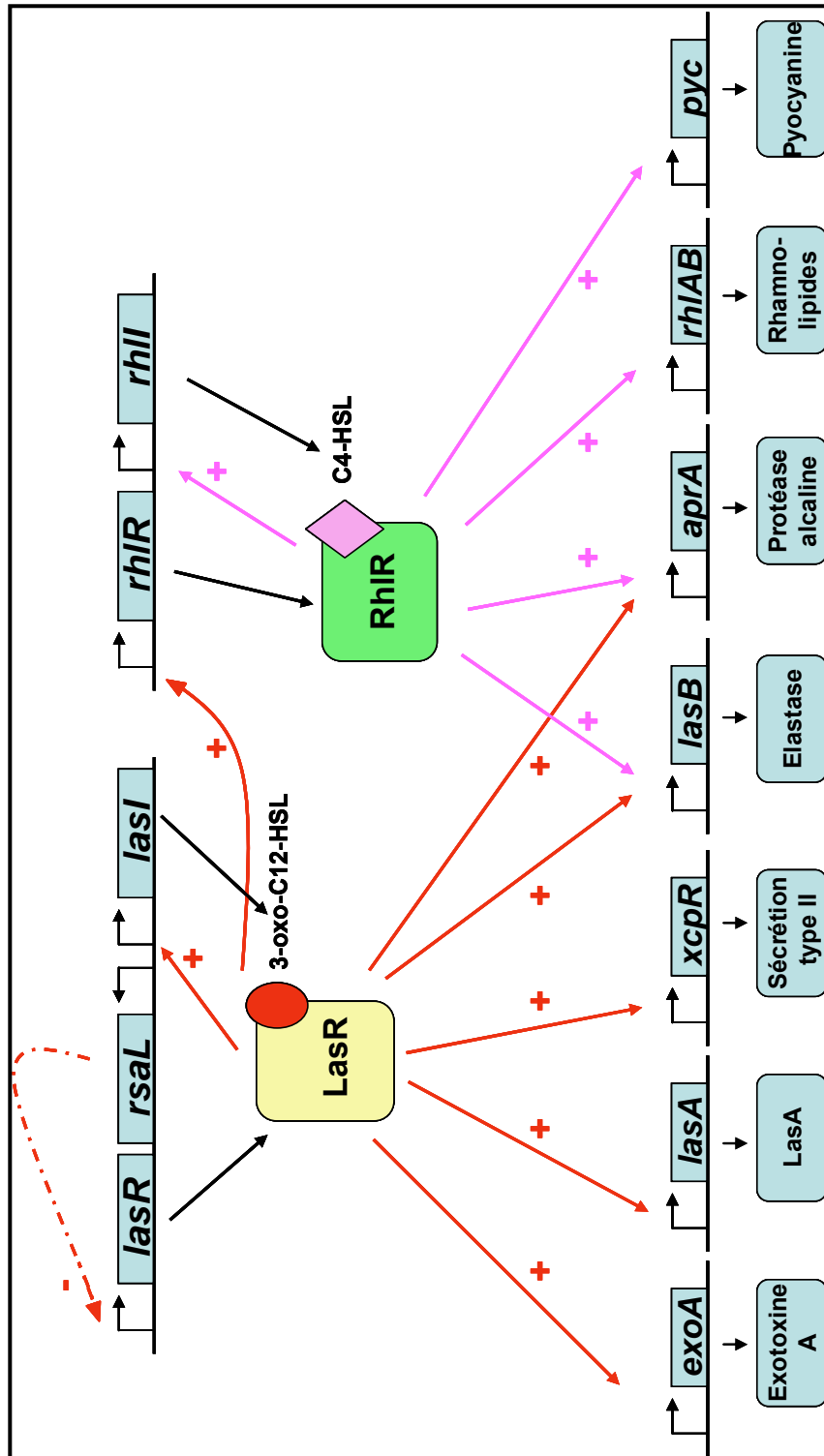


Figure I-6 : Les systèmes détecteurs de quorum de *P. aeruginosa* et leurs implication dans l'expression des facteurs de virulence d'après Ruimy et Andremont (2004).

1.2.4.2. La matrice

Les Biofilms de *P. aeruginosa* présentent une matrice extracellulaire composée essentiellement de polysaccharides mais aussi de protéines et d'acides nucléiques. Le rôle de chacun de ces composants n'a pas été clairement élucidé, néanmoins quelques fonctions ont pu leur être attribuées.

1.2.4.2.1. Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides des biofilms non muqueux

Le locus *pel* contient 7 gènes qui sont nécessaires à la formation de la matrice. Un mutant *pel* chez *P. aeruginosa* PA14 ne présente pas de défauts dans sa croissance, motilité et phénomène de trépidation indiquant que la fonction des flagelles et pilis de type IV n'est pas perturbée. Ce mutant n'est pas capable de former une pellicule à l'interface air-liquide d'un test en conditions statiques. Il est également incapable de former des biofilms matures sur une surface solide. Le produit de synthèse de ce locus interviendrait dans la capacité d'autoagrégation des cellules. De plus les biofilms formés par ces mutants ne sont pas résistants et sont sensibles aux tests de lavages des biofilms. Ce locus influencerait l'initiation du biofilm et aurait probablement un rôle dans l'attachement irréversible des cellules sur une surface abiotique (Friedman et Kolter, 2004 (a)). Le locus *pel* est responsable de la synthèse d'un exopolysaccharide riche en glucose. Parmi les 7 protéines, 4 d'entre elles, PelA, PelC, PelE, PelF présentent des similitudes avec des protéines intervenant dans la biosynthèse d'oligosaccharides. PelF présente des similitudes avec une glycosyltransférase de la famille GT4. Quatre d'entre elles, PelB, PelD, PelE, PelG, présentent des domaines transmembranaires et pourraient avoir un rôle dans l'exportation des ces glycanes. En effet, PelG est une protéine riche en leucine et isoleucine et posséderait 12 segments transmembranaires. Elle présente ainsi des similitudes avec les membres de la famille PST qui interviennent généralement dans la translocations de précurseur glycolipidiques synthétisés sur la face cytoplasmique de la membrane (Vasseur et al. 2005) (Tableau I-1).

Un deuxième exopolysaccharide intervient dans la formation du biofilm. 15 gènes (*ps/A- ps/O*) organisés en opéron codent les enzymes nécessaires à la synthèse et à la sécrétion d'un polysaccharide riche en mannose, glucose et rhamnose. Plusieurs prédictions ont été faites quand au rôle de certaines protéines codées par cet opéron *ps/*. L'analyse des gènes *ps/A* et *ps/C* suggère qu'ils codent respectivement une glucose et une rhamnose glycosyltransférase. (Friedman et Kolter (b), 2004) (Tableau I-2). *PsID* présente des similitudes avec *Wza* de *E. coli*, une lipoprotéine de la membrane externe intervenant dans le transport des polysaccharides constituant les capsules. *PlsD* serait une protéine sécrétée ayant un rôle dans le transport de ces exopolysaccharides (Campisano et al. 2006). L'étude de la régulation de cet opéron *ps/* a permis de mieux comprendre le rôle de ces exopolysaccharides dans la formation des biofilms. La séquence du promoteur ressemble à celle des promoteurs sous contrôle du facteur sigma 70, cet opéron serait donc exprimé constitutivement. Des fusions transcriptionnelles montrent que l'expression de cet opéron est régulée. Ainsi, dans les cellules à l'état planctonique, l'opéron est réprimé. C'est seulement à l'initiation du biofilm, au moment de l'attachement des cellules sur la surface du support que l'opéron *ps/* est exprimé. Après l'étape d'adhésion, l'opéron *ps/* est exprimé de façon localisée dans le biofilm, préférentiellement à l'intérieur des microcolonies. L'opéron *ps/* aurait donc un rôle dans la différenciation (Overhage et al. 2005).

| Protéine | Nombre d'acides aminés | % Identité |
|----------|------------------------|--|
| PelA | 948 | AA65-183 18% endo- α -1,4 polygalactosaminidase AA458-542 32% oligogalacturonide lyase |
| PelB | 1193 | nouvelle |
| PelC | 172 | AA52-131 29% galactoside 2- α -L-fucosyltransferase |
| PelD | 455 | AA25-86 30% L-lactate permease |
| PelE | 329 | AA230-27536% sucrose synthase |
| PelF | 507 | AA272-502 Motif glycosyltransferase, 28% WBT |
| PelG | 456 | Prédiction 11 hélices transmembranaires |

Tableau I-1 : Les protéines de biosynthèse d'un exopolysaccharide non muqueux riche en glucose chez *P. aeruginosa* (Friedman et Kolter, 2004 (b)).

| Protéine | Nombre d'acides aminés | % Similitude |
|----------|------------------------|---|
| PslA | 478 | 69% colanic acid UDP-glucose lipid carrier, WcaJ <i>E. coli</i> |
| PslB | 488 | 72% PMI/GDP-mannose pyrophosphorylase WbpW <i>P. aeruginosa</i> |
| PslC | 303 | 59% rhamnosyltransferase RfbN <i>Salmonella</i> |
| PslD | 256 | 47% amylovoran export protein AmsH <i>Erwinia</i> |
| PslE | 662 | 40% xanthan translocation protein GumC <i>Xanthomonas</i> |
| PslF | 395 | 38% β -xylosidase <i>Caldicellulosiruptor</i> |
| PslG | 442 | 43% GlcNac transferase <i>Bordetella</i> |
| PslH | 402 | 43% galactosyltransferase <i>Archaeoglobus</i> |
| PslI | 367 | 42% glycosyltransferase WbpJ <i>P. aeruginosa</i> |
| PslJ | 478 | 43% polysaccharide polymerase <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| PslKA | 469 | 45% membrane-associated virulence factor MviN <i>E. coli</i> |
| PslL | 355 | inconnue |
| PslM | 577 | 49% Rv3537 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| PslN | 333 | inconnue |
| PslO | 101 | inconnue |

Tableau I-2 : Les protéines de biosynthèse d'un exopolysaccharide non muqueux riche en mannose, glucose et rhamnose chez *P. aeruginosa* (Jackson et al. 2004).

Les exopolysaccharides des biofilms muqueux

L'alginate est le principal constituant des biofilms muqueux. C'est un polymère linéaire O-acétylé composé d'acide mannuronique et d'acide guluronique liés par des liaisons β -1,4. Le mécanisme de biosynthèse de cet exopolysaccharide fait intervenir un grand nombre de protéines. Parmi elles, AlgA, AlgC et AlgD participent, à partir du fructose-6-phosphate, à la synthèse de l'acide GDP mannuronique nécessaire à la polymérisation. Les produits des gènes *alg8* et *alg44*, des protéines transmembranaires, appartiendraient à la famille des glycosyltransférases de type 2 et participeraient à la polymérisation et au transport du polysaccharide en cours de synthèse à travers la membrane interne. Dans le périplasme certains résidus d'acide mannuronique sont épimérisés en acide guluronique grâce à AlgG, une C5-mannuronane épimérase. Certains résidus d'acide mannuronique sont alors acétylés sur les oxygènes O2 et O3 grâce aux produits des gènes *algF*, *algJ* et *algI*. L'alginate est ensuite exportée dans le milieu grâce à AlgE, une protéine de la membrane externe (Ramsey et al. 2005) (Figure I-7).

Cet exopolysaccharide n'est pas nécessaire à l'initiation et à la formation des biofilms. Il intervient beaucoup plus tard dans l'infection et rend le biofilm muqueux. Celui-ci sera plus résistant aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte. La régulation de la synthèse de ce polymère se fait essentiellement au niveau du gène *algD* qui est sous contrôle d'un promoteur reconnu par le facteur sigma alternatif σ_{22} ou AlgT. Dans un biofilm non muqueux, au début de l'infection, les produits des gènes *mucA* et *mucB* réprime l'expression de AlgT. Au cours du temps, *mucA* et *mucB* vont acquérir des mutations permettant la synthèse d'alginate. (Ramsey et al. 2005).

P. aeruginosa surproduit l'exopolysaccharide alginate lui permettant de surmonter les stress environnementaux. Il a été démontré que l'alginate affecte le système immunitaire en inhibant les fonctions leucocytaires, en interférant avec l'opsonisation de la bactérie et en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Pedersen et al. 1992).

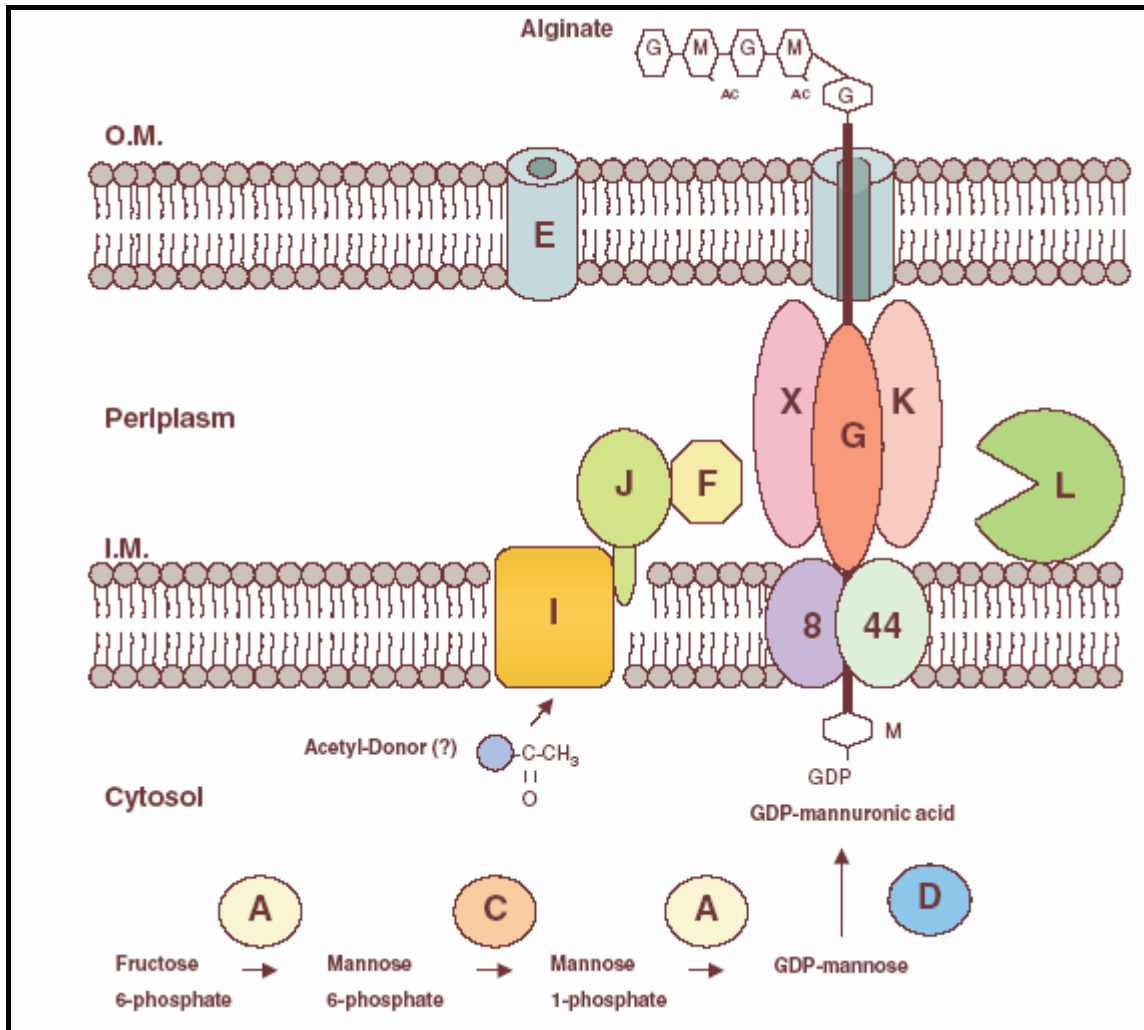


Figure I-7 : Les enzymes responsable de la synthèse de l'exopolysaccharide muqueux de *P. aeruginosa* : l'alginate (Ramsey et al. 2005).

1.2.4.2.2. Les protéines

Chez PA14, les gènes *lecA* et *lecB*, sous contrôle des systèmes capteur de quorum, codent des lectines, protéines qui reconnaissent des motifs glycaniques et qui interviennent dans l'interaction avec l'hôte (Winzer et al. 2000). LecA est une protéine tétramérique qui se lie spécifiquement au D-galactose et à ses dérivés hydrophobes. LecB reconnaît de préférence les résidus de L-fucose et de D-mannose. Ces lectines participent ainsi à l'adhérence des cellules à la matrice

d'exopolysaccharides mais également à l'interaction des cellules entre elles (Diggle et al. 2006).

De nombreuses lyases et polysaccharidases sont retrouvées dans cette matrice. Elles pourraient avoir un rôle dans la régulation dans la longueur de ces EPS et dans l'utilisation de ces EPS comme source de carbone. Chez PA14, il a été proposé que l'alginate lyase dégraderait les EPS afin de permettre la dispersion des cellules (Boyd et Chakrabarty, 1994).

1.2.4.2.3 L'ADN

L'ADN est un composant majeur de cette matrice. Il a été suggéré que cet ADN provienne de la lyse des cellules à la surface des biofilms (Matsukawa et Greenberg, 2004).

2. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)

La première mise en évidence des OPG est vraisemblablement la découverte de glucanes cycliques β -1,2 dans le milieu de culture de *A. tumefaciens*. Ces glucanes sont alors classés comme exopolysaccharides (McIntire et al. 1942). Les OPG ont été également détectés lors de l'étude du renouvellement des phospholipides dans la membrane cellulaire de *E. coli*. Des expériences de marquage au ^{32}P ont permis de mettre en évidence un rapide renouvellement du phosphatidylglycérol par transfert de *sn*-1-phosphoglycérol sur un oligosaccharide soluble du périplasma appelé alors MDO pour « Membrane Derived Oligosaccharide » (Van Golde et al. 1973). L'osmorégulation de ces β -glucanes de *E. coli* et *A. tumefaciens* a permis de mettre en évidence un caractère commun à ces deux molécules (Miller et al. 1986). Ces composés périplasmiques ont été regroupés sous le même nom : OPG (Bohin, 2000). Ces OPG sont retrouvés chez la plupart des protéobactéries. Ces molécules présentent des caractères communs mais néanmoins certaines différences existent en ce qui concerne la structure de ces glucanes et leur substitution.

2.1. La structure des OPG

Les OPG constituent une famille d'oligosaccharides périplasmiques qui partagent trois caractéristiques principales : ils sont constitués uniquement de résidus de glucose, le degré de polymérisation est limité et ils sont synthétisés en grande quantité dans des conditions de croissance de faible osmolarité.

Sur une base structurale, on distingue 4 familles d'OPG (Figure I-8) (Bohin, 2000).

2.1.1. Les OPG de la famille I

Les OPG de la famille I sont les OPG des entérobactéries (*E. coli* et *Erwinia chrysanthemi*) et des *Pseudomonas* (*P. syringae*), ils sont constitués de 5 à 12 résidus de glucose formant un squelette linéaire en β -1,2 avec des branches

constituées d'un unique résidu de glucose lié en β -1,6 (Figure I-8). Chez *E. coli*, les OPG sont substitués sur le carbone 6 des branches (Goldberg et al. 1981) par des groupements de phosphoglycérol, de phosphoéthanolamine provenant des phospholipides et de succinate. Le phosphoglycérol et le succinate confèrent à ces molécules un fort caractère anionique. Les OPG d'*E. chrysanthemi* possèdent sur leurs branches des résidus succinate, méthylmalonate et acétate. Par contre, les OPG de *P. syringae* sont neutres.

2.1.2. Les OPG de la famille II

Les OPG de la famille II sont retrouvés dans la famille des Rhizobiacées (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) et chez *Brucella abortus* (Breedveld et al. 1994). Ces OPG sont des molécules cycliques ne renfermant qu'un seul type de liaison β -1,2 et contenant 17 à 25 résidus de glucose (Figure I-8). Ces molécules peuvent être substitués par des résidus de phosphoglycérol mais également par des résidus succinyls et méthylmalonyls.

2.1.3. Les OPG de la famille III

Les OPG de la famille III ont été décrits chez les espèces *Bradyrhizobium* appartenant à la famille des Rhizobiacées. La taille du squelette glucosidique est très stricte (Rolin et al. 1992) (Breedveld et al. 1994). Il s'agit de molécules cycliques composées de 10 à 13 résidus de glucose liés par des liaisons β -1,3 et β -1,6. Chez *B. japonicum*, les OPG cycliques de DP 13 sont constitués d'un enchaînement de triplets de résidus de glucose liés en β -1,3 et de triplets de glucose liés en β -1,6 et le dernier résidu lié en α -1,3 (Figure I-8). Les OPG de *Azospirillum brasilense* (Altabe et al. 1998) ont pu être séparés en trois sous classes : Les glucanes de type I composés d'un cycle de 11 résidus de glucose, liés par 3 liaisons β -1,3, 8 liaisons β -1,6, sur lequel est branché un douzième résidu en β -1,4. Les glucanes de type II diffèrent des glucanes de type I par l'ajout d'un résidu de glucose lié en α -1,3. Enfin les glucanes de type III diffèrent des glucanes de type 2 par l'addition d'un groupement méthyle sur le carbone 2 du résidu de glucose lié en α .

2.1.4. Les OPG de la famille IV

Les OPG de la famille IV sont retrouvés chez *Ralstonia solanacearum* (Talaga et al. 1996), *Xanthomonas campestris* (York, 1995) (Talaga et al. 1996) et *Rhodobacter sphaeroides* (Talaga et al. 2002). Ils sont cycliques et possèdent un degré de polymérisation unique. Les OPG de ces espèces possèdent respectivement 13, 16 et 18 résidus de glucose liés en β -1,2 fermés par un résidu de glucose lié en α -1,6 (Figure I-8). Ces OPG peuvent être substitués par des résidus succinate ou phosphoglycérol.

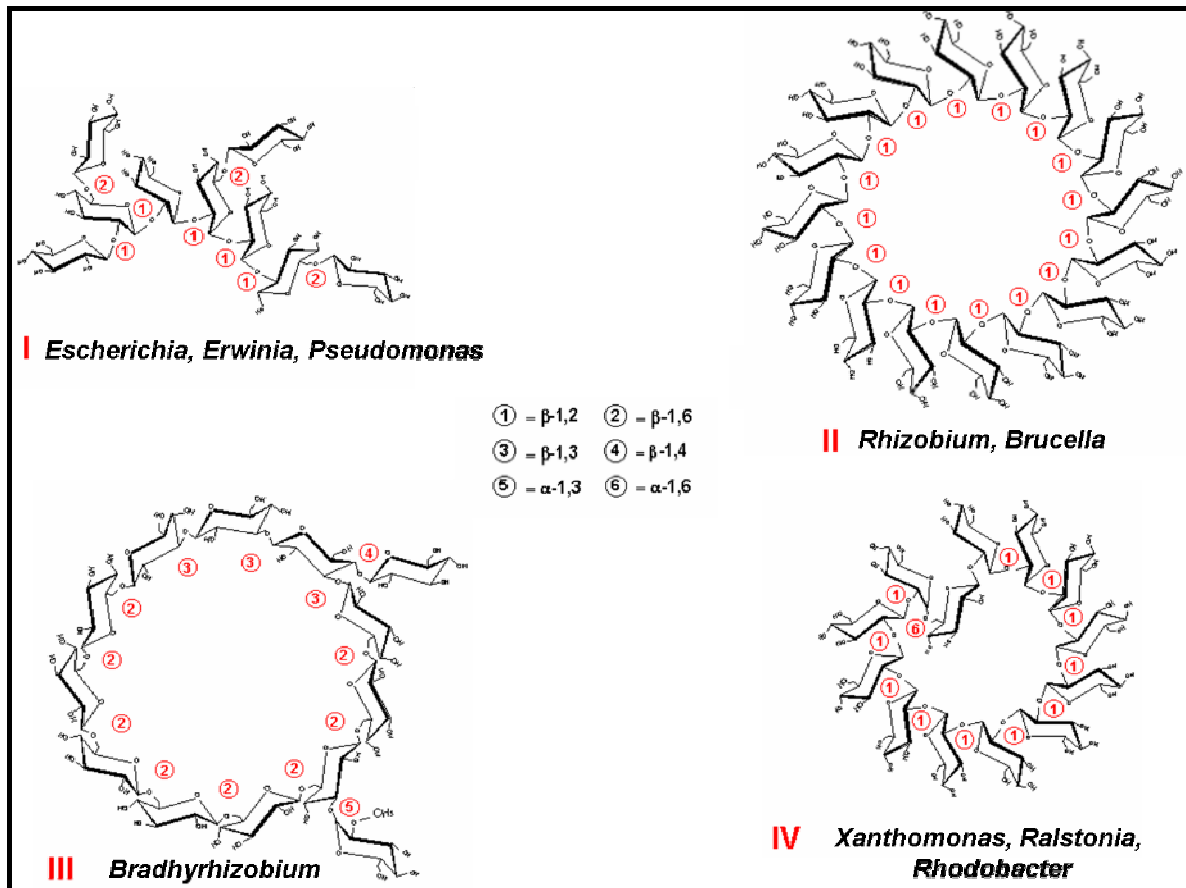


Figure I-8 : Représentation des quatre familles d'OPG (Bohin, 2000).

2.2. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille I

La synthèse des OPG ferait intervenir un complexe multienzymatique. Les gènes qui codent les protéines impliquées dans leur biosynthèse chez *E. coli* sont nommés *opg*. Chez *E. coli*, 5 gènes ont été décrits.

2.2.1. Le squelette

2.2.1.1 L'opéron *opgGH*

Les gènes *opgG* et *opgH*, situés à 24 min sur le chromosome, forment un opéron et codent respectivement les protéines OpgG et OpgH. Toutes deux sont responsables de la biosynthèse du squelette des OPG. En absence de l'une ou l'autre, la bactérie devient incapable de synthétiser ces OPG.

OpgH (97 kDa) est une protéine de la membrane interne possédant 8 segments transmembranaires (Figure I-9) (Debarbieux et al. 1997) (Figure I-9). Elle possède trois domaines cytoplasmiques nommés C1, C2 et C3 respectivement constitués de 138, 303 et 146 acides aminés. *In vitro*, en présence de l'Acyl Carrier Protein (ACP), OpgH catalyse le transfert de résidus de glucose à partir de l'UDP-glucose sur l'extrémité non réductrice d'une amorce d'octyl- β -glucoside par un mécanisme d'inversion de l'anométrie (Weissborn et Kennedy, 1984). Elle permet ainsi la formation du squelette linéaire formé de liaisons β -1,2.

Le profil des amas hydrophobes HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) de la protéine OpgH, effectué par B. Henrissat, a permis de classer cette protéine dans la famille des glycosyltransférases de type 2 (GT2). La classification des glycosyltransférases a été établie selon les critères suivants : La nature du substrat donneur de sucres, le type de réaction catalysée, les critères de similitude des séquences en acides aminés et la comparaison des amas hydrophobes (Saxena et al. 1995). Ces GT2 utilisent un NDP-glucoside d'anométrie α et synthétisent des liaisons d'anométrie β

par un mécanisme d'inversion d'anométrie. Il s'agit d'une substitution nucléophile de type 2 où l'accepteur provoque une attaque nucléophile du carbone C1 du sucre donneur activé. Ces GT2 sont caractérisées par la présence d'un domaine A dans lequel sont conservés deux résidus aspartiques et un domaine B dans lequel est conservé un résidu aspartique (Saxena et al. 1995). Le profil HCA de la protéine OpgH a permis d'identifier ces trois résidus aspartiques : le domaine central C2 renferme les résidus D285 et D346 appartenant au domaine A et D449 appartenant au domaine B. De la mutagenèse dirigée a été réalisée sur chacun de ces résidus. Dans chacun des cas, le changement d'un résidu aspartique en alanine abolit complètement l'activité *in vivo* de la protéine OpgH. Ces trois résidus seraient le siège de l'activité catalytique d'OpgH (Lequette, 2002). Par comparaison avec la GT2 SspA de *B. subtilis*, une glucosyltransférase impliquée dans la formation des tuniques lors de la sporulation, le substrat donneur de sucre serait fixé dans le domaine A au niveau de l'uracile par D285 et au niveau du groupe pyrophosphate de D346 en coopération avec l'ion Mg^{2+} . L'amorce située dans le domaine B subirait une attaque nucléophile de D449 engendrant une déprotonation du carbone C2 générant une forme ionique intermédiaire. Le carbone C2 activé provoquerait à son tour une attaque nucléophile sur le carbone C1 de l'UDP-glucose (Charnock et al. 1999) (Lequette, 2002).

Les comparaisons de séquence en acides aminés ont permis de montrer que la protéine OpgH possédait dans sa séquence un motif très conservé chez les protéines du système PTS. De plus, la protéine PtsG de *E. coli* contient un domaine IIC composé de huit segments transmembranaires impliqué dans la translocation du glucose à travers la membrane cytoplasmique. Par comparaison, les huit segments transmembranaires d'OpgH pourraient former un canal pour la translocation des OPG naissant (Lequette, 2002).

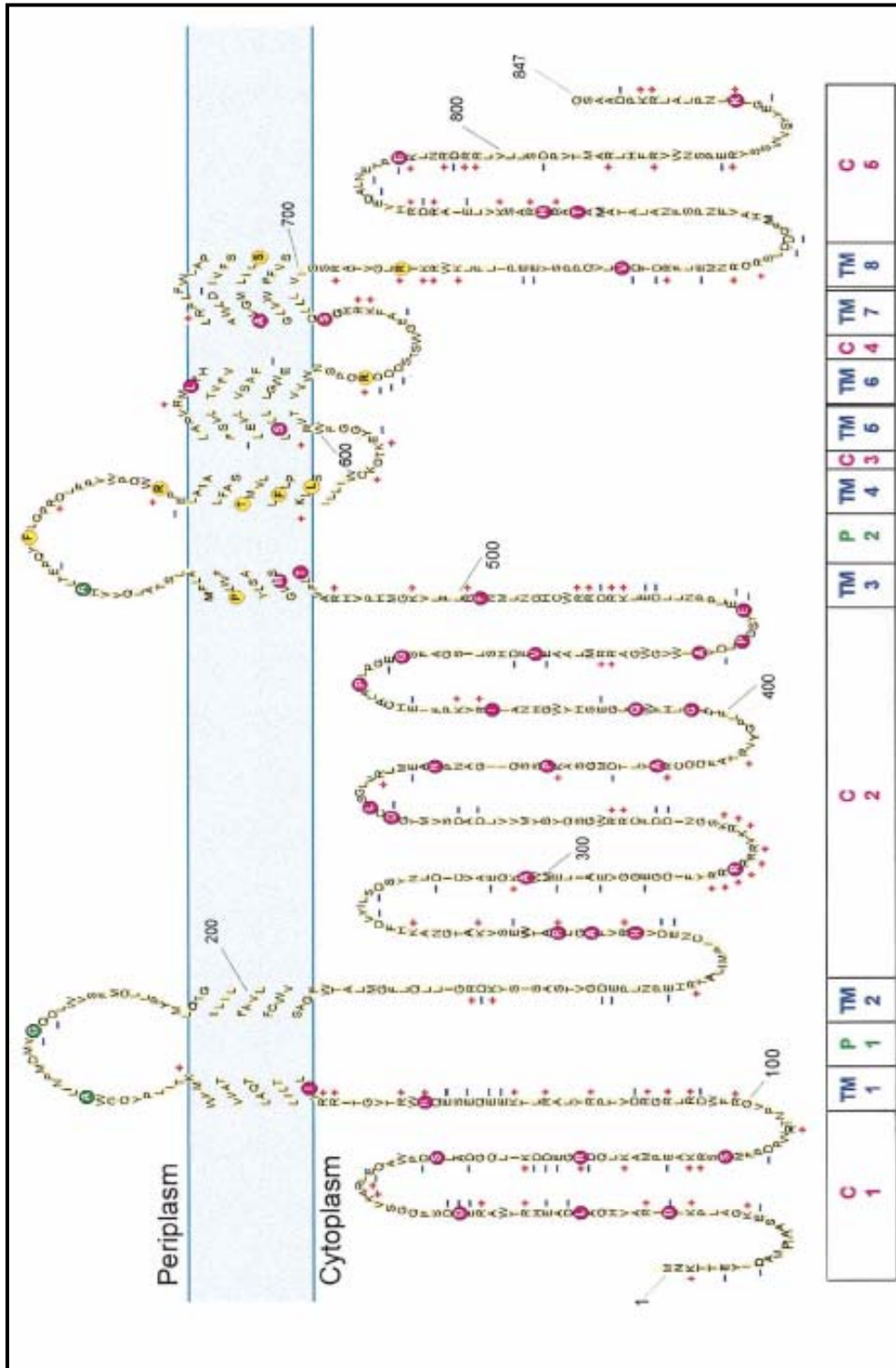


Figure I-9 : Topologie de la glucosyltransférase membranaire OpgH de *E. coli*. La position des différentes fusion *opgH-blam* sont indiquées par des cercles de couleur : le rouge indique une absence de résistance, le jaune une résistance partielle et le vert une résistance à 200µg/mL d'ampicilline (Debarbieux et al. 1997).

Le gène *opgG* code une protéine, OpgG, de 511 résidus (58 kDa). Il s'agit d'une forme précurseur comportant une séquence signal en N-terminale de 22 résidus, Met 1- Ala 22. Cette séquence est clivée via la machinerie Sec lors du passage du cytoplasme vers le périplasma. La forme mature d'OpgG comprend les résidus 23 à 511 avec une masse moléculaire de 56 kDa. La localisation périplasmique de cette protéine a été confirmée grâce à des fusions OpgG-PhoA uniquement actives après exportation dans le périplasma (Loubens et al. 1993). Son expression est indispensable à la synthèse des OPG. De plus cette protéine semble être un facteur limitant de ce complexe multienzymatique puisque une surexpression du gène *opgG* à partir d'un plasmide multicopie permet de synthétiser trois à quatre fois plus d'OPG.

Plusieurs hypothèses ont été émises quand au rôle de cette protéine. OpgH in vitro ne catalyse que des poly-glucanes linéaires β -1,2 non branchés et de degré de polymérisation plus long. OpgG pourrait agir comme une enzyme de branchement. Etant donné sa localisation périplasmique, OpgG ne pourrait utiliser l'UDP-glucose comme donneur et formerait des branches par remaniement du squelette linéaire. L'enzyme de branchement du glycogène de *E. coli* BE fonctionne de cette manière (Abad et al. 2002). Elle est capable de reconnaître et cliver les chaînes linéaires α -1,4 glucose et de rebrancher en α -1,6 par un mécanisme de rétention de l'anométrie. OpgG pourrait également permettre la libération des OPG dans le compartiment périplasmique. Enfin cette protéine pourrait collaborer étroitement avec OpgH pour faciliter la translocation du squelette glucosidique en cours de synthèse. Ces deux dernières hypothèses sont appuyées par le fait qu'en absence d'OpgG, la synthèse d'OPG est abolie.

La structure tridimensionnelle d'OpgG (PDB 1TXK) a été obtenue par cristallisation puis diffraction aux rayons X. OpgG est composée de deux domaines structuraux distincts tous deux très riches en feuillets β . Le domaine N-terminal (AA22→AA388) de type sandwich β se caractérise par la présence d'une cavité fortement électro-négative riche en résidus acides et hydrophobes qui pourrait être le site catalytique putatif d'OpgG (Figure I-10) (Hanouille et al. 2004).

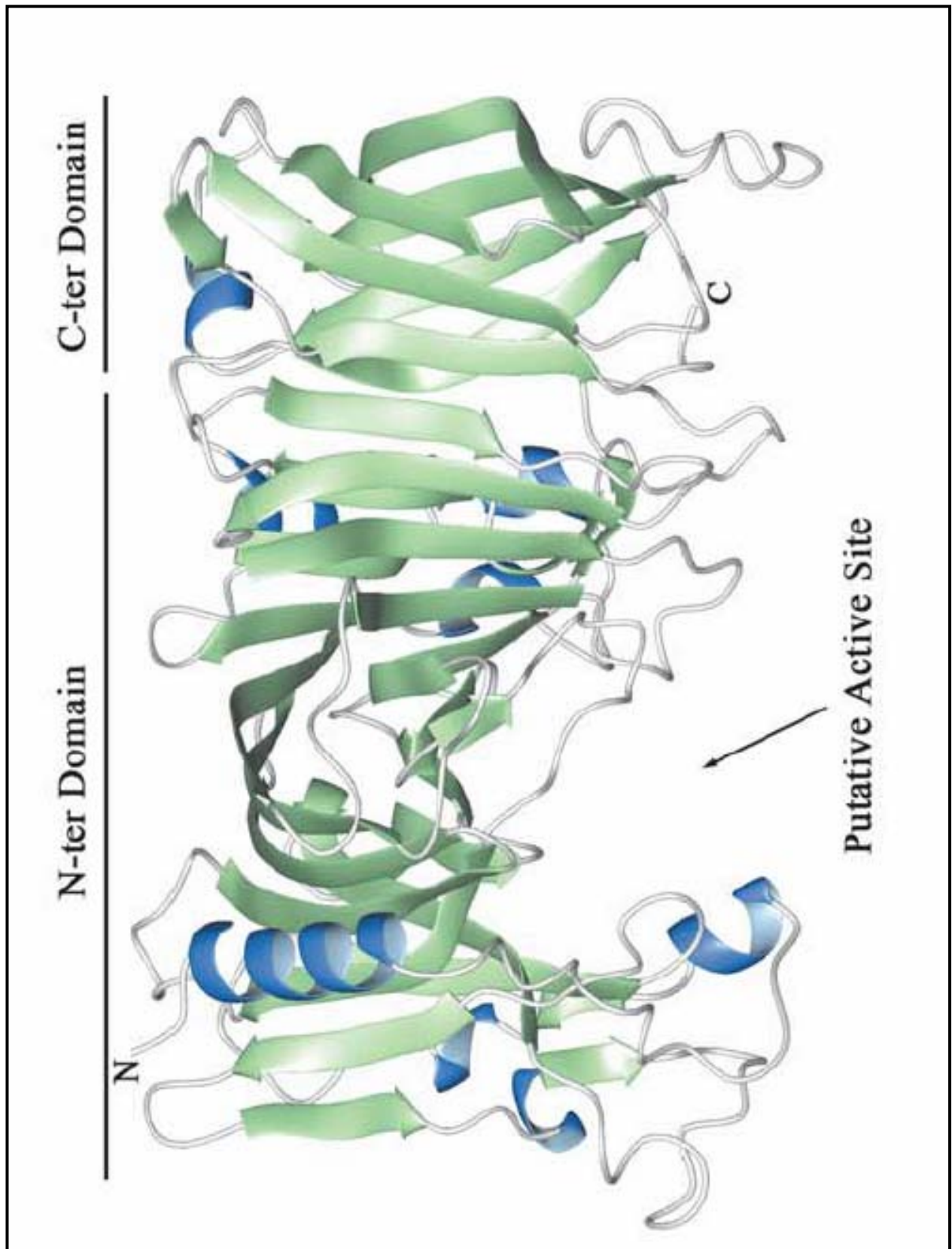


Figure I-10 : Structure tridimensionnelle d'OpgG de *E. coli* (PDB : 1TXK) : En bleu les hélices α et en vert les feuillets β . N et C représentent respectivement l'extrémité N-terminale et l'extrémité C-terminale (Hanouille et al. 2004)

2.2.1.2. *opgD* un paralogue d'*opgG*

Le gène *opgD* est un paralogue d'*opgG*, localisé à 32.2 min sur le chromosome. Le produit d'*opgD* est une protéine de 551 résidus d'acides aminés présentant 37,6% d'identité et 53,5% de similitudes sur 495 résidus alignés avec la séquence d'OpgG (Lequette et al. 2004). A la différence d'OpgG, OpgD possède une séquence signale en N-terminale de 32 résidus caractéristique du système TAT. En effet on y retrouve la séquence consensus xRRxFLK indispensable à la reconnaissance par les protéines membranaires constituant le système TAT. Le système TAT permet la translocation de protéines déjà structurées et bien souvent associées avec un cofacteur. L'inactivation de ce gène n'abolit pas la synthèse des OPG. Par contre la structure des OPG est modifiée. On observe une augmentation de la taille du squelette glucosidique. Les molécules formées sont constituées de 6 à 18 résidus de glucose. La fonction de cette protéine n'est à ce jour pas élucidée. Elle pourrait intervenir comme une protéine régulatrice du complexe d'autant plus qu'elle est majoritairement exprimée lors de la phase stationnaire alors que la synthèse des OPG s'effectue préférentiellement lors de la phase exponentielle. Il a été proposé qu'OpgD se fixerait, au cours de la phase stationnaire, sur les molécules d'OPG pour favoriser une interaction avec un capteur d'origine inconnue (Lequette, 2004).

2.2.2. La substitution

Chez *E. coli*, le squelette glucanique des OPG est modifié par différents substituants. Ceux-ci proviennent soit des têtes polaires de phospholipides membranaires : phosphoglycérol, phosphoéтанолamine; soit du métabolisme intermédiaire : succinyle. La substitution par le phosphoglycérol et par le succinyle confère un caractère acide ou anionique aux OPG. Par contre la substitution par la phosphoéтанолamine apporte un substituant zwitterionique qui n'apporte pas de charges aux molécules d'OPG. Les OPG constituent ainsi une famille hétérogène de molécules dont le caractère anionique peut aller jusqu'à 5 charges négatives, seulement une petite partie d'entre elles sont neutres. Ces OPG peuvent être séparés sur une chromatographie échange d'anions en fonction du rapport charge/masse (Figure I-11) (Lacroix et al. 1999).

2.2.2.1. La substitution par le succinate

Le gène *opgC* est localisé en amont de l'opéron *opgGH* et possède une orientation inverse. Le profil d'hydrophobie a prédit l'existence de 10 segments transmembranaires. Cette protéine de 45 kDa est impliquée dans la substitution par des résidus succinate, apportant ainsi une charge négative aux OPG (Figure I-11). OpgC pourrait catalyser le transfert de résidus succinate sur les OPG à partir d'un donneur cytoplasmique. Le succinyl-coenzyme A a été proposé comme substrat (Lacroix et al. 1999).

2.2.2.2. La substitution par le phosphoglycérol

Le gène *opgB* (Lanfroy et Bohin, 1993) code une protéine nécessaire à la substitution des OPG par le phosphoglycérol. *In vitro*, deux activités phosphoglycéroltransférasiques ont été décrites. La phosphoglycéroltransférase I (87 kDa) est associée à la membrane et catalyse le transfert des résidus phosphoglycérol sur le carbone 6 des OPG à partir des phosphatidylglycérols de la membrane cytoplasmique (Jackson et Kennedy, 1983).

La phosphoglycéroltransférase II est également codée par le gène *opgB* (Lequette, 2002). La phosphoglycéroltransférase membranaire subirait un clivage après le troisième segment transmembranaire libérant une protéine (56 kDa) soluble dans le périplasme qui catalyse le transfert de groupements phosphoglycérol d'une molécule d'OPG naissant à une autre soluble dans le périplasme (Kennedy, 1996) (Figure I-11).

2.2.2.3. La substitution par la phosphoéthanolamine

Des vésicules contenant de la ^3H phosphatidyléthanolamine en présence de cellules de *E. coli* non marquées ont permis de mettre en évidence un transfert de résidus phosphoéthanolamine sur les molécules d'OPG. Ce transfert apparaît osmorégulé (Miller et Kennedy, 1987).

A l'heure actuelle le ou les gènes impliqués dans la substitution de phosphoéthanolamine sur les branches n'ont pas encore été identifiés.

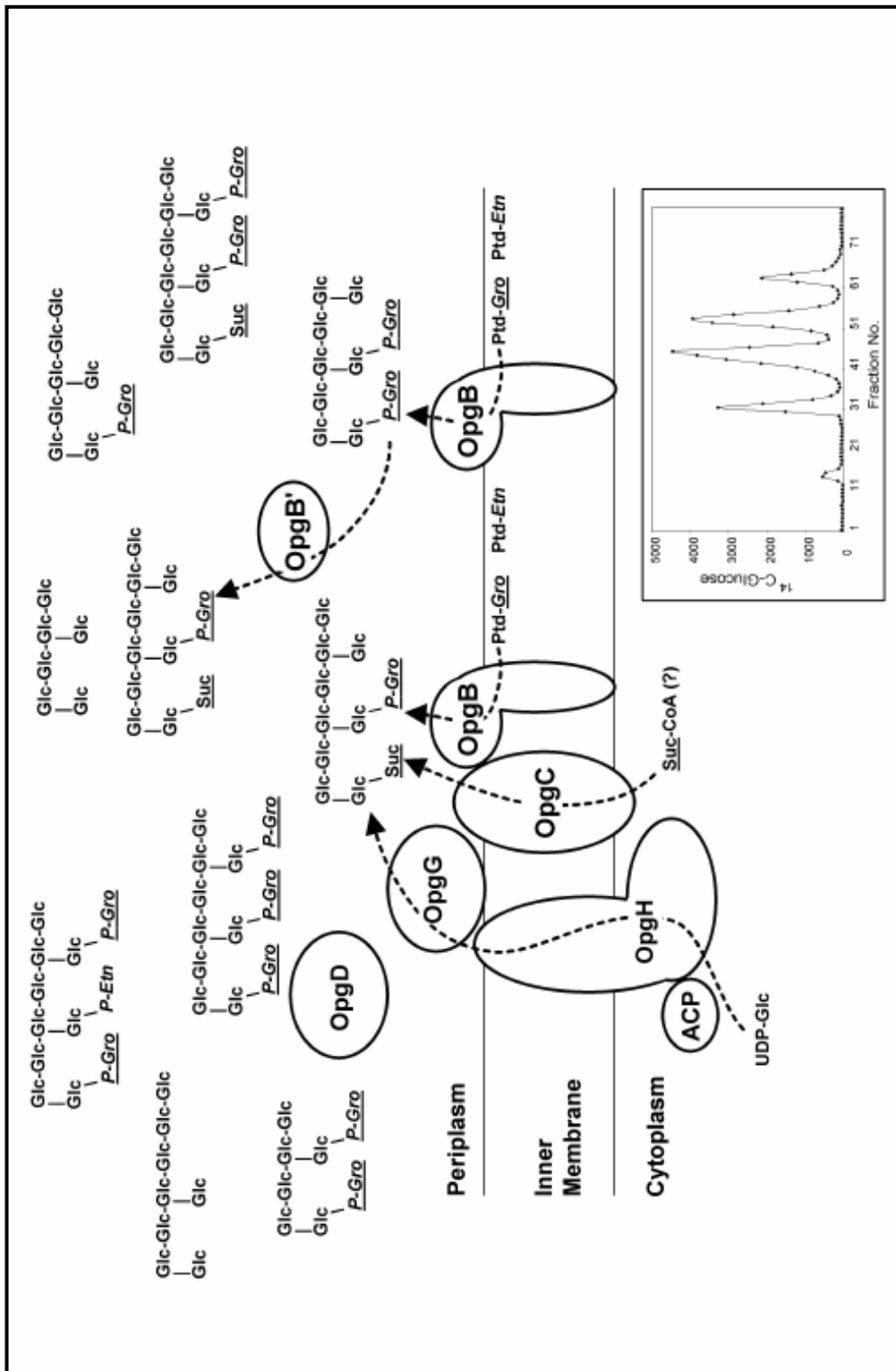


Figure I-11 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *E. coli* (Bohin et Lacroix, 2006). Séparation des OPG en chromatographie échange d'anions.

2.3. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille II

Les gènes retrouvés chez *S. meliloti* et *A. tumefaciens* sont caractéristiques des gènes de biosynthèse de la famille II. Deux gènes participant à la biosynthèse du squelette glucosidique ont été décrits. *ndvB/ndvA* chez *S. meliloti* et *chvB/chvA* chez *A. tumefaciens* (Breedveld et Miller, 1994) et *cgs/cgt* chez *B. abortus* (Inon de Iannino et al. 1998) (Roset et al. 2004).

ndvB/chvB/cgs codent une protéine transmembranaire à haut poids moléculaire (316 à 319 kDa). Chez *B. abortus*, la topologie membranaire de cette protéine a pu être caractérisée grâce à des fusions *cgs-blaM* et *cgs-phoA*. Cgs possède 6 segments transmembranaires délimitant 4 larges domaines cytoplasmiques et trois petites régions périplasmiques (Ciocchini et al. 2004). Ces protéines possèdent de fortes homologies. NdvB/ChvB/Cgs sont classées dans la famille des glycosyl-hydrolases GH94 et sont indispensables à la biosynthèse de glucanes cycliques β -1,2-glucose à partir de l'UDP-glucose. NdvB/ChvB/Cgs interviendraient à la fois dans l'initiation, l'élongation et la cyclisation. Ces protéines possèderaient plusieurs domaines fonctionnels. Il a été montré que 40% de la protéine située en C-terminal n'intervenait pas dans la synthèse de ces molécules. Un test *in vitro* à partir de fractions membranaires non purifiées a permis la synthèse de ces glucanes cycliques β -1,2-glucose à partir de l'UDP-glucose. Un intermédiaire glucosidique lié de manière covalente à une protéine de haut poids moléculaire a été mis en évidence chez *S. meliloti*. Cette protéine correspondrait à NdvB (Breedveld et Miller, 1994).

Les gènes *ndvA/chvA/cgt* codent une protéine de la membrane interne (65 à 67 kDa). Ces protéines possèdent de grandes homologies de séquence. NdvA/ChvA/Cgt montrent des homologies avec les transporteurs ABC, notamment avec HlyB, une protéine de la membrane interne, chez *E. coli*, qui est impliquée dans la sécrétion de l'hémolysine par le système de type I. Il a été proposé que NdvA/ChvA/Cgt aurait un rôle dans la sécrétion des OPG dans le périplasme et/ou dans le milieu extracellulaire. Cette hypothèse a été confirmée par la construction des mutant *ndvA* et *cgt*. En absence de ces protéines, les OPG ne sont plus sécrétés

et ne présentent plus de caractère anionique, la virulence est atténuée (Breedveld et Miller 1994) (Roset et al. 2004).

Le gène *cgmB*, chez *S. meliloti*, code une protéine soluble responsable de la substitution des OPG par le phosphoglycérol. CgmB ne présente que 17,3% de similitude avec OpgB, la phosphoglycéroltransférase I de *E. coli* (Wang et al. 1999). Plus récemment, un gène homologue d'*opgC* codant une succinyltransférase chez *R. sphaeroides* a été identifié chez *B. abortus* (Roset et al. 2006).

2.4. Les gènes et les enzymes de biosynthèse 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.

Deux gènes liés *ndvB* et *ndvC* de *B. japonicum* ont été mis en évidence par la capacité à compléter une souche *ndvB* de *S. meliloti* (Bhagwatt et al. 1996, 1993). Les produits de ces gènes, NdvB (102 kDa) et NdvC (62 kDa), sont probablement des protéines liées à la membrane. *ndvB* est indispensable à la synthèse d'OPG. NdvB ne présente aucune similitude avec NdvB de *S. meliloti*. Cette protéine est composée de plusieurs domaines dont un appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases GH17 et un autre se rapprochant des glycosyltransférases de type II (Bohin et Lacroix, 2006). L'interruption de *ndvC* n'engendre pas de diminution de synthèse d'OPG mais leur structure est modifiée. Les OPG produits sont cycliques et ne présentent que des liaisons β -1,3-glucose (Bhagwatt et al. 1999). NdvC présente des similitudes avec une glucanosyltransférase de *C. albicans* et avec des régions conservées de site actif d'enzymes intervenant dans le métabolisme du glucane. Il a été proposé que NdvB initie la polymérisation d'un β -1,3-glucane cyclique et que NdvC catalyserait la formation de liaisons β -1,6 glucosidiques. Plus récemment un troisième gène indispensable à la synthèse de ces molécules a été mis en évidence. Le gène *ndvD*, situé dans une région intergénique de *ndvB* et *ndvC*, code une protéine de 26 kDa liée à la membrane par un unique segment transmembranaire. Cette protéine n'est pas indispensable à la

synthèse *in vitro* de ces OPG (Chen et al. 2002). Elle n'a donc pas un rôle dans la synthèse du squelette, son rôle reste à être élucidé.

2.5. Les gènes et les enzymes de biosynthèse des OPG de la famille IV

Les gènes de biosynthèse des OPG ont été identifiés chez *Rhodobacter sphaeroides* (Cogez et al. 2002). Le génome de *R. sphaeroides* possède à la fois un gène *ndvB* de type *cgs* sur le chromosome II et les gènes *opgG* et *opgH* sur le chromosome I. Chez *R. sphaeroides*, une interruption du gène *ndvB* ne perturbe pas la synthèse d'OPG qui ont une structure identique aux OPG synthétisés par une souche sauvage. L'opéron *opgGIH* sur le chromosome I est indispensable à cette synthèse d'OPG. Une interruption dans chacun de ces trois gènes empêche la synthèse de ces molécules. *opgG* code une protéine de 540 acides aminés. Les 32 premiers acides aminés ont été prédits comme une séquence signal permettant l'exportation vers le cytoplasme de la protéine mature de 502 acides aminés. Cette protéine possède 40% d'identité de séquence et 58% de similitude avec *opgG* de *E. coli*. *opgH* code une protéine de 595 acides aminés. Cette protéine possède une masse moléculaire très inférieure à celle de OpgH de *E. coli*. La zone de conservation (38 % identité et 53% de similitude avec OpgH de *E. coli*) comprend le large domaine cytoplasmique, les segments transmembranaires 3 à 8, la boucle périplasmique B2 ainsi que le début du domaine C-terminal cytoplasmique de *E. coli*. Comme chez *E. coli*, OpgH de *R. sphaeroides* présente un domaine cytoplasmique conservé de GT2. Chez *R. sphaeroides*, la région intergénique de 320 pb entre *opgG* et *opgH* comprend une courte phase ouverte de lecture, *opgl*. Ce gène code une petite protéine de 66 résidus qui ne présente pas d'homologie significative avec d'autres protéines connues. L'introduction des gènes *opgl* et *opgH* dans un mutant *opgH* de *E. coli* à partir d'un plasmide multicopie restaure la synthèse d'OPG. Ces OPG ont un degré de polymérisation plus hétérogène allant de 5 à 18 résidus de glucose. Il a été proposé que chez *R. sphaeroides*, OpgH, une GT2, catalyserait la polymérisation d'une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -1,2. OpgG serait responsable de la formation de la liaison α -1,6 qui cyclise ces OPG. La fonction de la protéine Opgl n'est pas élucidée. Elle 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 *opgl* et *opgH* nécessaire à l'expression de *opgH* (Cogez et al. 2002). *opgC* code une protéine de 399 acides aminés. Cette protéine ne présente pas de similitudes avec OpgC de *E. coli*. Par contre ces deux protéines semblent avoir la même organisation structurale et la même fonction. OpgC de *R. sphaeroides* serait une protéine transmembranaire, 11 segments transmembranaires ont été prédits. Elle est également impliquée dans le transfert des résidus succinates.

Chez *Xanthomonas campestris*, une mutagenèse par insertion de transposon a permis d'identifier le gène *opgH* également indispensable à la synthèse de ces OPG (Minsevage et al. 2004). L'analyse du génome de *X. campestris* montre la présence du gène *opgB* qui code une protéine de 702 résidus. Cette protéine présente 37,9 % d'identité sur 433 résidus alignés avec la séquence de OpgB (763 aa) de *E. coli*. Jung et al. (2005) ont pu séparer deux familles d'OPG : une majorité d'OPG neutres, non chargés et une minorité d'OPG substitués par un ou deux résidus phosphoglycérol.

2.6. Phylogénie des gènes de biosynthèse des OPG

Les gènes de biosynthèse d'OPG peuvent être divisés en trois classes. Les gènes de type *opg* responsable de la biosynthèses des OPG des familles I et IV, les gènes de type *ndvAB* responsable de la biosynthèse des OPG des familles II et III et les gènes de type *ndvBC* synthétisant les OPG de la famille III (Tableau I-3).

2.6.1. *opgH*, *opgG* et *opgD* au sein des protéobactéries

Les gènes *opg* sont les plus représentés chez les protéobactéries.

Le gène *opgH* est présent chez toutes les espèces qui possèdent dans leur génome les gènes de type *opg*. La similitude de séquence entre OpgH de *E. coli*. et ses orthologues peut aller de 94% chez *Salmonella typhi* à 22% chez *Vibrio cholerae*. Le gène *opgG* n'est pas présent chez toutes les espèces. La similitude de séquence entre OpgG de *E. coli* et ses orthologues peut aller de 96% chez *S. typhi* à 32% chez

V. cholerae. Plusieurs organisations génomiques comprenant les gènes *opg* ont été retrouvées.

La première organisation génomique est représentée chez certaines espèces de la subdivision gamma des protéobactéries comme *E. coli*, *P. syringae* et *E. chrysanthemi* responsables de la synthèse des OPG de la famille I. Les gènes *opgG* et *opgH* sont organisés en opéron et sont tous les deux indispensables à la synthèse d'OPG. Dans certain cas, un troisième gène *opgD*, un paralogue d'*opgG*, semble intervenir dans l'organisation du squelette glucosidique.

La deuxième organisation génomique est représentée chez *R. sphaeroides*. Les gènes *opgG* et *opgH* sont également organisés en opéron mais une ORF supplémentaire *opgl* est intercalée entre ces deux gènes. Les gènes *opgGIH* sont indispensables à la synthèse des OPG de la famille IV. Le gène *opgD* est également retrouvé.

Enfin la troisième organisation génomique est représentée chez *X. fastidiosa*. Le gène *opgG* est absent du génome. Un seul gène *opgH* semble responsable de la synthèse des OPG (Vilas-Boas L. A., communication personnelle). Le gène *opgD* est également retrouvé.

Dans ces différentes organisations génomiques, les gènes *opgG* et *opgD* peuvent être retrouvés sur le même génome ou au contraire séparément. Une analyse phylogénétique montre que les protéines OpgG et OpgD des différentes espèces bactériennes forment respectivement deux groupes d'orthologues. La quasi-totalité des protéines OpgD identifiées possèdent une séquence signal TAT alors que les OpgG en ont une caractéristique du système Sec.

2.6.2. *ndv* au sein des protéobactéries

Les gènes similaires au gène *ndv* 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. Ces gènes permettent la biosynthèse des OPG de la

famille II sauf pour *A. brasilense* qui synthétise des OPG de la famille III. Un locus *ndvB* a aussi été identifié chez *R. sphaeroides* mais ne participe pas à la synthèse des OPG.

| Subdivision gamma | Famille Opg | | | | | Famille Ndv | | |
|---|-------------|-------------|------|-------------|------|-------------|-------|------|
| | OpgC | OpgG | OpgH | OpgD | OpgB | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | OpgC | OpgG | OpgH | OpgD | OpgB | | | |
| <i>Salmonella thyphimurium</i> | OpgC | OpgG | OpgH | OpgD | OpgB | | | |
| <i>Shigella flexneri</i> | | OpgG | OpgH | OpgD | OpgB | | | |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | | OpgG | OpgH | | | | | |
| <i>Erwinia carotovora</i> | | OpgG | OpgH | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | OpgG | OpgH | | | | NdvB* | |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | | OpgG | OpgH | OpgD | | | | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | | OpgG | OpgH | | | | | |
| <i>Shewanella oneidensis</i> | | OpgG (2) | OpgH | OpgD | | | | |
| <i>Vibrio cholerae</i> | | OpgG | OpgH | | | | | |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | | | OpgH | OpgD | OpgB | | NdvB | |
| <i>Xanthomonas axonopodis</i> | | | OpgH | OpgD | OpgB | | NdvB | |
| <i>Xylella fastidiosa</i> | | | OpgH | OpgD | | | | |
| <i>Wigglesworthia glossinidia brevipalpis</i> | | | OpgH | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Subdivision beta | | | | | | | | |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | | OpgG | OpgH | OpgD (2) | | | | |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | | OpgG | OpgH | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Subdivision alpha | | | | | | | | |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | OpgC | OpgG | OpgH | OpgD | | | NdvB | |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | | | | | CgmB | NdvA | NdvB | |
| <i>Brucella abortus</i> | Cgm | | | | | ChvA | NdvB | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | | | | | | ChvA | ChvB | |
| <i>Rhizobium loti</i> | OpgC | | | | | NdvA | | |
| <i>Brucella suis</i> | OpgC | | | | | ChvA | | |
| <i>Brucella melitensis</i> | OpgC | | | | | NdvA | | |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | | OpgG | OpgH | | | NdvA | NdvB* | NdvC |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | | | | | | | ChvB | |
| <i>Caulobacter crescentus</i> | | | OpgH | | | | | |
| <i>Rhodopseudomonas palustris</i> | OpgC | OpgG | OpgH | | | NdvA | | |
| <i>Bartonella henselae</i> | OpgC | | | | | | | |
| <i>Bartonella quintana</i> | OpgC | | | | | | | |

Tableau I-3 : Les protéines de biosynthèse des différentes familles d'OPG : en jaune, les protéines de biosynthèse des OPG de la famille I ; en orange, les protéines de biosynthèse des OPG de la famille II ; en rose, les protéines de biosynthèse des OPG de la famille III et en violet, les protéines de biosynthèse des OPG de la famille IV. * : la protéine NdvB de *B. japonicum* se rapproche des glucosyltransférases de type II. (2) indique la présence de deux copies du gène sur le chromosome d'après Bohin, (2000).

2.7. Régulation de la biosynthèse des OPG

La biosynthèse des OPG est régulée à deux niveaux.

2.7.1. Osmorégulation

La biosynthèse de OPG chez les protéobactéries est soumise à une osmorégulation (Kennedy, 1982). La synthèse d'OPG est abondante quand l'osmolarité du milieu est faible, environ 100 mOsm. Dans le cas de *E. coli*, les OPG représentent 5% du poids sec de la cellule. Une augmentation de l'osmolarité diminue de manière drastique cette quantité d'OPG, même si un osmoprotecteur comme la bétaine est présent dans le milieu. Lorsque l'osmolarité du milieu atteint 600 mOsm, la quantité d'OPG dans le périplasme chute en dessous de 0,5% du poids sec de la cellule (Lacroix et al. 1989). Quand l'osmolarité du milieu décroît brusquement, il faut une génération pour observer l'augmentation de synthèse des OPG. De façon similaire, une augmentation accrue de l'osmolarité stoppe rapidement la synthèse de ces OPG mais il faut plusieurs générations pour diluer cette quantité d'OPG car aucune dégradation n'est observée. Cette osmorégulation est observée également chez *R. sphaeroides*, *R. solanacearum*, et *E. chrysanthemi*. Cette osmorégulation semble intervenir à deux niveaux : une régulation transcriptionnelle et/ou une régulation post-traductionnelle selon les espèces.

2.7.1.1. Régulation de l'activité enzymatique

Des expériences *in vitro* ont été réalisées chez *E. coli* (Rumley et al., 1992) et *S. meliloti* (Zorreguieta et al. 1990). L'activité de biosynthèse de la glucosyl-transférase a été mesurée à l'aide d'extraits membranaires dans différentes conditions d'osmolarité. Pour faire varier l'osmolarité du milieu deux types de composés ont été rajoutés : des composés ioniques (K^+ , NaCl) ou neutres (saccharose, mannitol). De façon intéressante, on observe une inhibition significative de la synthèse des glucanes uniquement en présence des composés ioniques. Les composés neutres ne semblent pas avoir d'impact sur cette synthèse. La régulation enzymatique semble dépendre *in vitro* de la force ionique plus que de l'osmolarité.

Chez certaines espèces, les protéines intervenant dans la substitution des OPG sont osmorégulées, c'est le cas de la protéine CmgB, chez *S. meliloti* (Breedveld et al. 1995). Par contre chez *E. coli*, la protéine OpgB n'est pas sujette à ce type de régulation. En effet, les OPG synthétisés à basse et haute osmolarité possèdent le même taux de substitution par le phosphoglycérol (Lequette, 2002). Chez *E. chrysanthemi* et chez *B. abortus*, la substitution par le succinate diminue quand l'osmolarité augmente (Cogez et al. 2001) (Roset et al. 2006). Le mode de régulation est à ce jour inconnu.

2.7.1.2. Régulation génétique

Lacroix et al. (1991) ont réalisé une fusion traductionnelle *opgGH::lacZ* sur un plasmide multicopie. L'expression de cette protéine hybride est 7 fois plus élevée dans un milieu de basse osmolarité en comparaison au niveau d'expression dans le même milieu dans lequel a été rajouté 0,3M de NaCl. De plus la mesure du taux d'ARNm de l'opéron *opgGH* de *E. coli* à partir d'un plasmide multicopie est 5 fois plus élevée dans le milieu de basse osmolarité. Cette régulation osmotique est indépendante de la concentration d'OPG dans le périplasme. La transcription de l'opéron *opgGH* semble être régulée en fonction de l'osmolarité.

L'opéron *opgGH* est sous contrôle du facteur alternatif σE (Dartigalongue et al. 2001). σE est impliqué dans la réponse initiée par la présence de protéines mal conformées de l'enveloppe.

Chez *S. meliloti*, on observe une régulation transcriptionnelle du gène *cgmB*. La régulation des OPG semble être régulée au niveau enzymatique et au niveau transcriptionnelle (Wang et al. 1999).

L'activité de biosynthèse des OPG semble être régulée à deux niveaux. La régulation enzymatique pourrait expliquer la rapide inhibition de la synthèse des OPG lors d'une augmentation brutale de l'osmolarité du milieu. L'augmentation de la force ionique en résultant inhiberait les enzymes de biosynthèse des OPG permettant une adaptation rapide des cellules. La régulation transcriptionnelle prendrait ensuite le relais pour une adaptation de plus longue durée au changement d'osmolarité du milieu.

2.7.2. Rétrocontrôle négatif

Le rétrocontrôle négatif a été observé dans une souche d'*E. coli pgi, zwf* incapable de synthétiser des OPG en absence d'apport de glucose. Après addition de glucose dans le milieu de croissance, les OPG s'accumulent rapidement et atteignent la quantité qui serait normalement produite par une souche sauvage. Cette inhibition par la concentration des OPG périplasmique est indépendante de l'osmolarité du milieu (Lacroix, 1989). Ces mêmes conclusions ont été observées chez *R. leguminosarum* (Breedveld et al. 1992). Par contre, ce type de rétrocontrôle n'est pas observé chez toutes les protéobactéries capable de synthétiser des OPG.

2.8. OPG et interaction avec la cellule hôte

Les premiers mutants altérés dans la synthèse d'OPG ont été obtenus lors de criblages visant à obtenir des mutants de pathogène non virulents ou ayant une virulence atténuée. Il apparaît que les OPG ont un rôle dans le processus de virulence à la fois dans le règne animal et dans le règne végétal. Ils sont aussi nécessaires au processus de symbiose des Rhizobiacées avec les plantes.

2.8.1. Règne végétal

A. tumefaciens est responsable de la galle du collet chez les plantes dicotylédones. Cette bactérie est capable de transférer et d'intégrer dans les cellules de la plante hôte une portion du ADN-T d'un plasmide inducteur de tumeur. Les gènes ADN-T code des régulateurs de croissance, des auxines et cytokinines responsable de la formation de la tumeur chez la plante. Des mutants défectueux dans l'étape d'attachement à la cellule végétale du tabac ont été isolés. Une insertion du transposon Tn5 dans les gènes *chvB* et *chvA* a permis de montrer que les OPG de *A. tumefaciens* étaient impliqués dans l'étape d'attachement de la bactérie avec la cellule végétale (Puvanesarajah et al. 1985).

Chez *P. syringae* une interruption du locus *hrpM* montre une perte totale de virulence sur le haricot. *hrp* « hypersensitive reaction and pathogenicity » regroupe l'ensemble des gènes nécessaires à la pathogénicité vis-à-vis de la plante hôte. *hrpM* est le locus génétique constitué des gènes *opgG* et *opgH* (Loubens et al. 1993) nécessaires à la synthèse des OPG.

Erwinia chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène responsable de la pourriture mole sur de nombreux végétaux comme le sinpolia, le chrysanthème. La virulence de cette bactérie est associée à la synthèse et la sécrétion de nombreuses enzymes (pectinases, cellulase...) qui déstructurent la paroi de la cellule végétale. Cette dégradation permet la propagation de la maladie et fournit une source de carbone pour la croissance du pathogène. Une interruption de l'opéron *opgGH* provoque un phénotype pleiotrope. Les mutants *opg* sont muqueux dû à une surproduction d'exopolysaccharides. Les cellules ont une motilité réduite, sont hypersensibles aux sels biliaires. Elles présentent une activité pectinolytique réduite due à une baisse d'expression des gènes *pel* et *out* responsables respectivement de la production et de la sécrétion de ces enzymes de dégradation. Enfin, ces mutants présentent une complète perte de virulence sur pomme de terre et feuilles d'endives. *E. chrysanthemi* est capable de libérer une partie des OPG dans le milieu extracellulaire. Une coinoculation de la souche sauvage et du mutant *opg* montre que ces mutants sont viables sur le tissu végétal. Par contre il n'y a pas de complémentarité intercellulaire entre le sauvage et le mutant restaurant la croissance de celui-ci. Il apparaît que la perte de virulence ne résulte pas d'une simple perte de motilité et de sécrétion d'exoenzymes. Les OPG sont requis pour la croissance et la colonisation des bactéries sur les tissus végétaux et leur localisation doit être périplasmique (Page et al. 2001).

B. japonicum est responsable d'une interaction symbiotique avec des légumineuses comme le soja. Elle provoque un nodule racinaire dans lequel elle fixe l'azote atmosphérique. Beaucoup de polysaccharides (EPS, LPS, OPG et antigène K) sont nécessaires au développement de cette symbiose. Des mutants de synthèse de ces polysaccharides provoquent un défaut d'infection dû à l'accumulation par la plante de composés phénoliques (glyocelline) à activité de type antibiotique. Une interruption des gènes *ndvB* et *ndvC* provoque la formation de pseudo-nodules incapables de

fixer l'azote contenant une concentration élevée en glyocelline. Il apparaît que les OPG auraient un rôle de suppression des mécanismes de défense de la plante hôte (Bhagwat et al. 1999).

2.8.2. Règne animal

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

S. typhimurium est responsable d'infections alimentaires et de diarrhées à travers le monde. Chez la souris, elle provoque une infection similaire à la fièvre typhoïde humaine. Des mutations par insertion aléatoire de transposon ont été criblées par la mesure de la dose létale à 50% (DL50 : provoquant 50% de mortalité sur une souche sensible de souris). Une insertion du transposon MudJ a été retrouvée dans le gène *opgB* responsable de la substitution par le phosphoglycérol. Ce mutant présente une DL50 1000 fois supérieure à celle de la souche sauvage (Bowe et al. 1998).

Des expériences similaires ont été réalisées sur la souche *P. aeruginosa* PA14 sur laquelle des tests de pathogénicité sur plusieurs hôtes ont été développés. Un mutant par insertion de *TnphoA* dans le gène *opgH* n'est pas capable de croître sur la plante *A. thaliana*, ne provoque pas la mort rapide du ver *C. elegans* après ingestion et ne tue pas la souris (Mahajan-Miklos et al. 1999).

B. abortus est un pathogène intracellulaire capable de contourner le système immunitaire de la cellule hôte. Un mutant *cgs* est rapidement évacué par les macrophages. Les OPG représenteraient un facteur de virulence capable d'interagir avec le cholestérol présent dans les membranes de l'hôte et de modifier ainsi le trafic intracellulaire à son avantage (Arellano-Reynoso et al. 2005).

2.9. Rôle des OPG dans l'enveloppe bactérienne

2.9.1. Phénotype pleiotrope

Les souches incapables de produire des OPG montrent un phénotype pleiotrope qui indique une probable altération des propriétés de l'enveloppe. Ces phénotypes pleiotropes peuvent différer d'une espèce à une autre. Chez les Rhizobiacées, *E. chrysanthemi* et *E. coli*, les mutants Opg^- montrent un phénotype muqueux en raison de l'hyperproduction d'EPS (Ebel et al. 1997) (Page et al. 2001) (Breedveld et al. 1994). L'absence d'OPG provoque un défaut de motilité et de chimiotactisme probablement dû à un déficit du nombre de flagelles (Fiedler et Roterling, 1988). Les mutants *ndv* de *S. meliloti* et *A. tumefaciens* sont incapables de croître en milieu hypo-osmotique, ce n'est pas le cas chez *E. coli* et *E. chrysanthemi* qui sont parfaitement capables de croître dans un milieu de faible osmolarité (Breedveld et al. 1994) (Kennedy, 1996) (Page et al. 2001). Les mutants Opg^- présentent une hypersensibilité à certaines substances chimiques comme des antibiotiques chez *S. meliloti* (Dylan et al. 1990), les sels biliaires chez *E. chrysanthemi* (Page et al. 2001) ou encore le sodium dodecyl sulfate chez *E. coli* (Rajapogal et al. 2003). Chez *E. coli*, un mutant *opgGH* empêche l'expression de la protéine de lyse du phage MS2 (Holtje et al. 1988). Chez *E. chrysanthemi*, les mutants Opg^- produisent et secrètent de faible quantité de protéases, cellulases et pectate lyase (Page et al. 2001). Enfin, la plupart de ces mutants sont affectés dans leur virulence. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle des OPG dans le périplasme de la bactérie. Les OPG pourraient avoir un rôle osmoprotecteur (Kennedy, 1996). Ils pourraient également être un signal de faible osmolarité reconnu par des couples capteur-régulateur comme EnvZ/OmpR (Fiedler et Roterling, 1988) ou RcsC/RcsB (Ebel et al, 1997).

2.9.2. Adaptation à un environnement hypo-osmotique

La première hypothèse formulée de la fonction des OPG a été un rôle osmoprotecteur (Kennedy, 1996). La synthèse des OPG est accrue en milieu de

faible osmolarité et leur concentration peut atteindre 10 à 50 mM selon les espèces. Dans une cellule bactérienne, le périplasme et le cytoplasme présentent la même osmolarité. Ainsi, dans un milieu hypo-osmotique, l'osmolarité du périplasme est supérieure à celle du milieu. Pour éviter une trop grande différence entre l'osmolarité du milieu (<50 mOsM) et celle du cytoplasme (300 mOsM), les OPG seraient synthétisés. Ces molécules, ayant une masse moyenne de 1500 à 2500 Da selon les espèces, ne peuvent pas diffuser à travers la membrane externe. Les OPG seraient responsables du maintien de l'osmolarité du périplasme. Cet effet osmoprotecteur serait accentué par leur caractère anionique. Il a été proposé que les OPG participeraient au maintien du potentiel de Donnan. La synthèse de ces molécules anioniques permettrait également de maintenir un certain volume périplasmique à basse et osmolarité modérée (Cayley et al. 2000). Des mutations qui bloquent la synthèse des OPG chez *R. meliloti* et *A. tumefaciens* empêchent leur croissance dans un milieu hypoosmotique. Dans un milieu hyperosmotique, celle-ci n'est pas perturbée (Dylan et al. 1990) (Cangelosi et al. 1990). La présence des OPG est donc importante pour l'adaptation de ces espèces à un environnement hypo-osmotique. Néanmoins, certaines espèces sont capables de croître dans un milieu de faible osmolarité sans production d'OPG comme *E. coli* et *E. chrysanthemi*. Certaines espèces synthétisent des OPG non chargés. Il apparaît que l'osmoprotection ne serait pas la principale fonction des OPG (Bohin 2000).

2.9.3. Les OPG, un signal cellulaire ?

Chez *E. coli*, l'absence des OPG perturbe les systèmes capteur/régulateur EnvZ/OmpR et RcsCBD (Fiedler et Roterling, 1988) (Ebel et al. 1997). Les systèmes de régulation à deux composants sont des systèmes enzymatiques de transduction de signaux capables de détecter les changements de l'environnement et de déclencher la réponse adaptée de la cellule par le contrôle de la transcription de gènes. Ces systèmes sont constitués d'un capteur membranaire qui est un dimère d'une protéine kinase composée d'un domaine capteur qui perçoit un signal et d'un domaine d'autophosphorylation. Le régulateur possède également deux domaines, un domaine récepteur et un domaine régulateur responsable de la reconnaissance des zones régulatrices des gènes cibles et de l'activation transcriptionnelle. La

transmission de l'information se fait par transphosphorylation depuis un résidu histidine phosphorylé du capteur membranaire à un résidu aspartate du domaine régulateur du 2ème composant, le régulateur cytoplasmique.

Le système EnvZ/OmpR régule l'expression des porines OmpF et OmpC. EnvZ est sensible à la charge ionique du périplasme. Dans un milieu de faible osmolarité, cette force ionique pourrait être apportée par une concentration élevée d'OPG chargés négativement. La motilité réduite des mutants *opg* peut-être aussi expliquée. L'opéron *fhlDC* responsable de la synthèse des flagelles est également sous le contrôle du système EnvZ/OmpR (Geiger et al. 1992).

Le caractère muqueux des mutants *opg* s'explique par la surexpression des gènes *cps* responsable de la synthèse de la capsule. Le système RcsCBD régule l'expression des gènes *cps* en fonction de l'osmolarité du milieu. L'absence d'OPG semble influencer sur le niveau d'expression des gènes nécessaires à la synthèse des EPS. Plus récemment, la recherche de mutations suppressives du phénotype mutants *opgG* de *E. chrysanthemi* a permis d'isoler une mutation dans le gène *rscC* capable de restaurer les caractères sauvages à l'exception de la virulence sur la feuille d'endive. Cette mutation suppressive affecte RcsC au niveau de la charnière située entre le domaine transmembranaire et le domaine d'autophosphorylation (Bouchart, 2006). Les OPG pourraient représenter un signal indicateur de l'osmolarité du milieu reconnu par le capteur membranaire RcsC.

3. Objectifs

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) interviennent dans le processus de virulence chez de nombreuses espèces (*Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae*, *Brucella abortus*...). Diverses études ont ainsi montré l'importance de ces molécules dans l'interaction avec l'hôte, aussi bien végétal, animal ou humain. Dans une première partie nous nous intéresserons au pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* qui est responsable de nombreuses maladies chez l'être humain. Cette bactérie exprime de nombreux facteurs de virulence et est capable de s'organiser en biofilm.

Le travail, entrepris en collaboration avec Yannick Lequette, vise à déterminer les gènes intervenant dans la biosynthèse de glucanes périplasmiques chez *P. aeruginosa* et de voir l'éventuel impact sur la formation de ces biofilms. Chez *P. aeruginosa*, deux loci peuvent être potentiellement impliqués dans la biosynthèse des OPG. L'opéron *opgGHPa* code des protéines qui présentent 82% et 74% de similitude avec les protéines OpgG et OpgH d'*E. coli*. Une interruption de ce locus chez *P. aeruginosa PA14* a un impact sur la virulence de cette bactérie puisqu'une forte diminution du nombre de nématodes et de souris tuées a été observée (Mahajan-Miklos et al. 1999). Le gène *ndvB_{Pa}* présente 58% d'identité avec le gène *ndvB_{Bj}* de *Bradyrhizobium japonicum* qui code une glucosyltransférase nécessaire à la synthèse d'OPG cycliques liés en β -1,3. Une interruption de ce gène augmente la sensibilité aux antibiotiques de biofilms normalement constitués. Les auteurs proposent que *ndvB_{Pa}* serait responsable de la synthèse de glucanes périplasmiques cycliques qui se fixerait aux antibiotiques et empêcheraient leur diffusion dans le cytoplasme (Mah et al. 2003).

Une délétion totale de chacun de ces loci sera réalisée dans la souche *P. aeruginosa PA14* par insertion de cassette. Une analyse structurale comparative par spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse permettra de déterminer les gènes de biosynthèse des OPG mais aussi de classer ces molécules dans les différentes familles. La formation des biofilms sera observée en flux continu de nutriments durant une période de 5 jours. Nous pourrons ainsi comparer les étapes de formation des biofilms des différents mutants avec la souche sauvage *P. aeruginosa PA14*.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude des enzymes de biosynthèse des OPG de *E. coli*. L'opéron *opgGH* code les deux protéines indispensables à la synthèse des ces glucanes périplasmiques. OpgH, une glucosyltransférase de type 2 située dans la membrane interne, catalyse la biosynthèse du squelette linéaire β -1,2-gucose à partir d'un donneur de sucre activé, l'UDP-glucose cytoplasmique. OpgG, une protéine périplasmique sécrétée par le système Sec, aurait deux fonctions distinctes : elle interagirait avec OpgH pour la synthèse du squelette et elle aurait un rôle dans la formation des branches par réarrangement du squelette linéaire.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre le rôle d'OpgG. Notre but est de construire les premiers mutants ponctuels d'OpgG et de voir un éventuel impact sur la biosynthèse des ces molécules glucaniques. Nous envisagerons une stratégie de mutagenèse localisée. Nous délimiterons les régions très conservées du gène *opgG* chez les protéobactéries. Nous amplifierons ces régions par PCR dégénérée de manière à introduire une ou deux mutations ponctuelles. Nous nous aiderons également de la structure tridimensionnelle d'OpgG (Hanouille et al. 2004). Cette protéine présente deux domaines structuraux. Le domaine N-terminal, de type sandwich β , est un analogue structural du domaine catalytique de la galactomutarotase de *Lactococcus lactis*. Ce domaine est constitué de plusieurs feuillets β qui délimitent une cavité électro-négative susceptible de porter l'activité catalytique d'OpgG. Ainsi, les résidus conservés de la cavité seront soumis à de la mutagenèse dirigée.

Le domaine C-terminal est un domaine à repliement de type immunoglobuline analogue du domaine N-terminal de l'enzyme de branchement du glycogène. Ce domaine est très faiblement conservé chez les OpgG des protéobactéries. Nous choisirons d'en déléter ce domaine.

Le gène *opgD* est un paralogue d'*opgG*. Il code une protéine sécrétée dans le périplasme par le système TAT qui n'est pas essentielle à la synthèse des OPG. Jusqu'à présent son rôle n'a pas encore été élucidé mais son absence conduit à la formation de polymères de degré de polymérisation plus grand (Lequette et al. 2004). Etant donné les fortes similitudes en séquences en acides aminés entre OpgG et OpgD, nous entreprendrons de cristalliser OpgD, en collaboration avec Vincent Villeret, afin de mettre en évidence des différences structurales qui nous aiderait à la compréhension du rôle de ces deux protéines dans le complexe multienzymatique.

Le travail de la thèse était basé, à l'origine, sur les relations structure-fonction des protéines de biosynthèse des OPG chez *E. coli*. Etant donné l'incertitude des résultats, j'ai effectué en parallèle la détermination des OPG chez *P. aeruginosa*. Normalement ce travail était prévu sur une période de 4 ans mais les nouvelles directives de l'école doctorale ne m'ont pas permis d'effectuer une quatrième année. Il est évident que certains travaux présentés dans cette thèse manquent de résultats.

II Résultats et discussion

Partie I : La synthèse des OPG chez *Pseudomonas aeruginosa*

Mah et collaborateurs (2003) ont recherché des mutants par insertion de transposon afin de trouver des gènes ayant une influence sur la résistance des biofilms aux antibiotiques. Ils ont ainsi caractérisé un gène qui présente 58% de similitudes avec le gène *ndvB_{Bj}* de *Bradyrhizobium japonicum* codant une glucosyltransférase nécessaire à la synthèse d'OPG cycliques liés en β -1,3. Ils en ont conclu que le gène *ndvB_{Pa}* était responsable de la biosynthèse d'OPG cycliques chez *P. aeruginosa*. Ce travail a attiré notre attention puisque nous nous attendions, comme chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas syringae*, à trouver des OPG linéaires. Ces résultats nous ont surpris d'autant plus qu'il existe, dans le génome de *P. aeruginosa*, l'opéron *opgGH_{Pa}* qui code des protéines présentant 82% et 74% de similitude avec les protéines OpgG et OpgH d'*E. coli*. Dans ce travail, nous avons entrepris de déterminer les gènes de biosynthèse des OPG chez *P. aeruginosa* et de déterminer la structure de ces molécules.

1. Construction du mutant Δ *opgGH_{Pa}*

La construction du mutant Δ *opgGH_{Pa}* a été réalisée par Yannick Lequette. La délétion totale de l'opéron *opgGH_{Pa}* a été obtenue par un événement double de recombinaison entre l'opéron *opgGH_{Pa}* porté par le chromosome de *P. aeruginosa* et par une cassette de résistance à la gentamycine bordée de deux fragments d'ADN de 1580 pb et 1590 pb contenant respectivement la région en amont du codon d'initiation du gène *opgG_{Pa}* et la région en aval du codon stop du gène *opgH_{Pa}*.

2. Purification par chromatographie de filtration sur gel P6

Les différentes souches ont été cultivées dans un milieu de faible osmolarité, le milieu LOS. L'extraction des OPG a été réalisée sur l'extrait cellulaire, en phase stationnaire après 15h de croissance, en utilisant la méthode au charbon. Les extraits ont été ensuite purifiés sur chromatographie de filtration sur Biogel P6 (voir matériels et méthodes). Un dosage à l'antrone sulfurique a été réalisé sur chaque fraction afin de révéler la présence d'oses neutres.

La colonne P6 a été préalablement étalonnée avec un extrait d'OPG de *E. coli* (DF214) marqué au ^{14}C -Glucose (données non présentées). Les OPG, synthétisés par *E. coli*, sortent entre 52 et 77 mL avec un maximum situé à 62 mL.

Dans la souche sauvage, le passage sur la colonne de filtration sur gel P6 nous a permis de séparer deux composés, tous deux réagissant avec l'antrone sulfurique, donc tous deux constitués d'hexoses. Ces polysaccharides sont respectivement élués entre les fractions 68 et 79 les fractions 81 et 97 (Figure II-I-1).

En ce qui concerne le premier composé, il n'y a pas de différences significatives avec les deux mutants ΔopgGH_{Pa} et ΔndvB_{Pa} . Par contre dans le cas du mutant ΔopgGH_{Pa} le deuxième pic est absent. Dans le cas du mutant ΔndvB_{Pa} , ce deuxième pic est présent. L'opéron opgGH_{Pa} est responsable de la synthèse du deuxième composé. Les fractions ont été rassemblées puis soumises à une analyse structurale plus approfondie (Figure II-I-2).

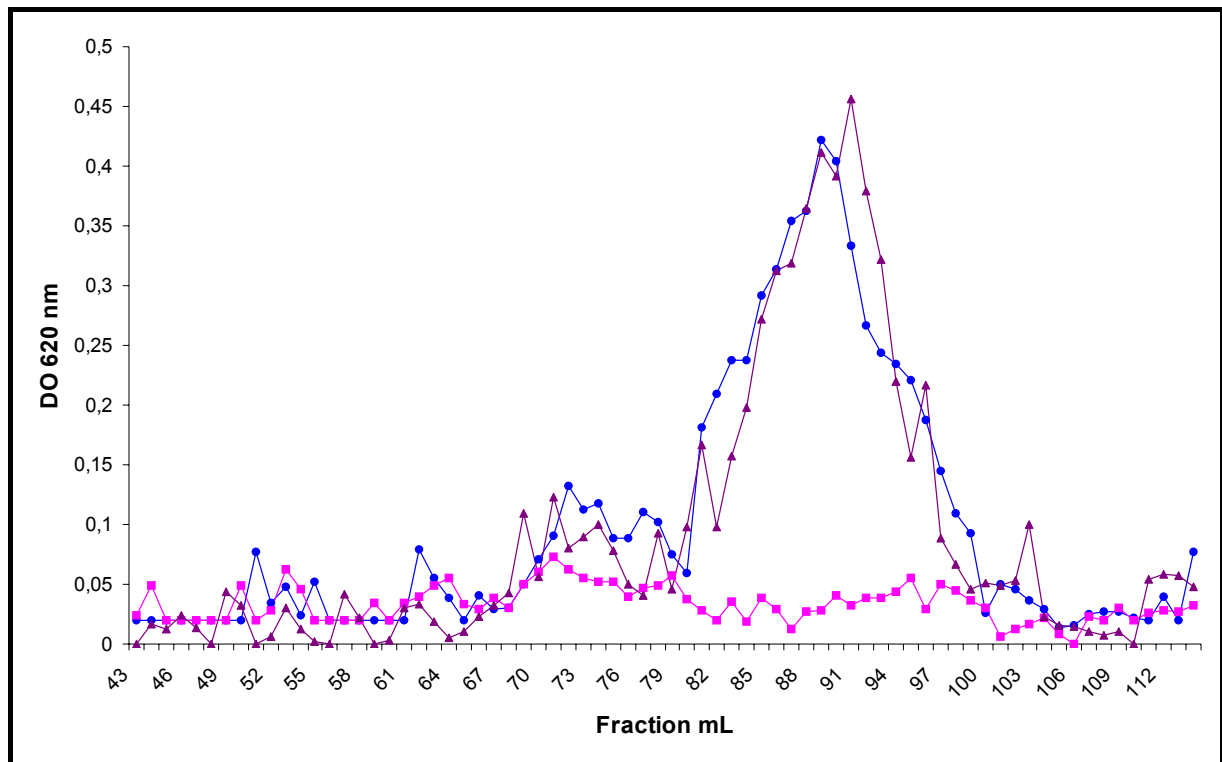


Figure II-I-1 : Chromatographie de filtration sur gel P6 : En abscisse, chaque fraction correspond à 1 mL collectés à 10 mL/h. En ordonnée est indiquée la densité optique à 620nm obtenue lors du dosage des oses neutres à l'antrone sulfurique. -○- ; -Δ- ; -□- correspondent respectivement à PA14, $\Delta ndvB_{Pa}$ et $\Delta opgH_{Pa}$.

3. Analyse en spectrométrie de masse MALDI

Dans le cas du sauvage et du mutant $\Delta ndvB_{Pa}$, l'analyse en spectrométrie de masse MALDI en mode positif révèle un profil typique obtenu pour les OPG des entérobactéries comme *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi* ou de pseudomonades comme *P. syringae*. Les 5 ions $[M + Na]^+$ de rapport m/z 1013, 1175, 1337, 1499 et 1661 correspondent à des hexoses linéaires dont le degré de polymérisation varie de 6 à 10 résidus avec un maximum de 7-8. On peut noter la présence de pics de plus faible intensité dont la valeur m/z se situe à 1113, 1275, 1437 et 1599, celles-ci représentent une différence d'incrément de masse de 100 avec respectivement les valeurs m/z 1013, 1175, 1337 et 1499 (Figure II-I-2). L'analyse de ces mêmes OPG traités avec du KOH (cf. matériels et méthodes) montre la disparition de ces 4

espèces. Ces OPG sont donc substitués par un groupement ester de masse moléculaire 100 Da, probablement des résidus succinates (Figure II-I-2).

Cette même analyse dans le cas du mutant $\Delta opgGH_{Pa}$ montre l'absence de ces différentes espèces confirmant ainsi que l'opéron $opgGH_{Pa}$ est nécessaire à la biosynthèse des OPG chez *P. aeruginosa* (Figure II-I-2).

Le premier produit, purifié lors du passage en chromatographie de filtration sur gel P6 et correspondant aux fractions d'éluion 68 à 79, a également été soumis à une analyse en spectrométrie de masse MALDI en mode positif. Les profils obtenus aussi bien dans le cas de la souche sauvage, du mutant $\Delta opgGH_{Pa}$ que du mutant $\Delta ndvB_{Pa}$ sont trop complexes et nous avons été incapables d'attribuer les différents ions $[M + Na]^+$.

4. Analyse en GC-MS

Les dérivés partiellement méthylés et acétylés du deuxième composé ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse. L'analyse révèle la présence de 12% de 3,4-di, 40% de 3,4,6-tri et 35% de 2,3,4,6-tetra-O-méthylglucose. Ces glycanes linéaires sont uniquement constitués de résidus de glucose liés par des liaisons 1,2 avec des branches en 1,6. On peut estimer qu'une molécule moyenne d'OPG est constituée de 7 résidus de glucose formée de trois résidus linéaires liés en 1,2, d'un point de branchement, de deux résidus aux extrémités non réductrices et d'un résidu à l'extrémité réductrice (Figure II-I-3).

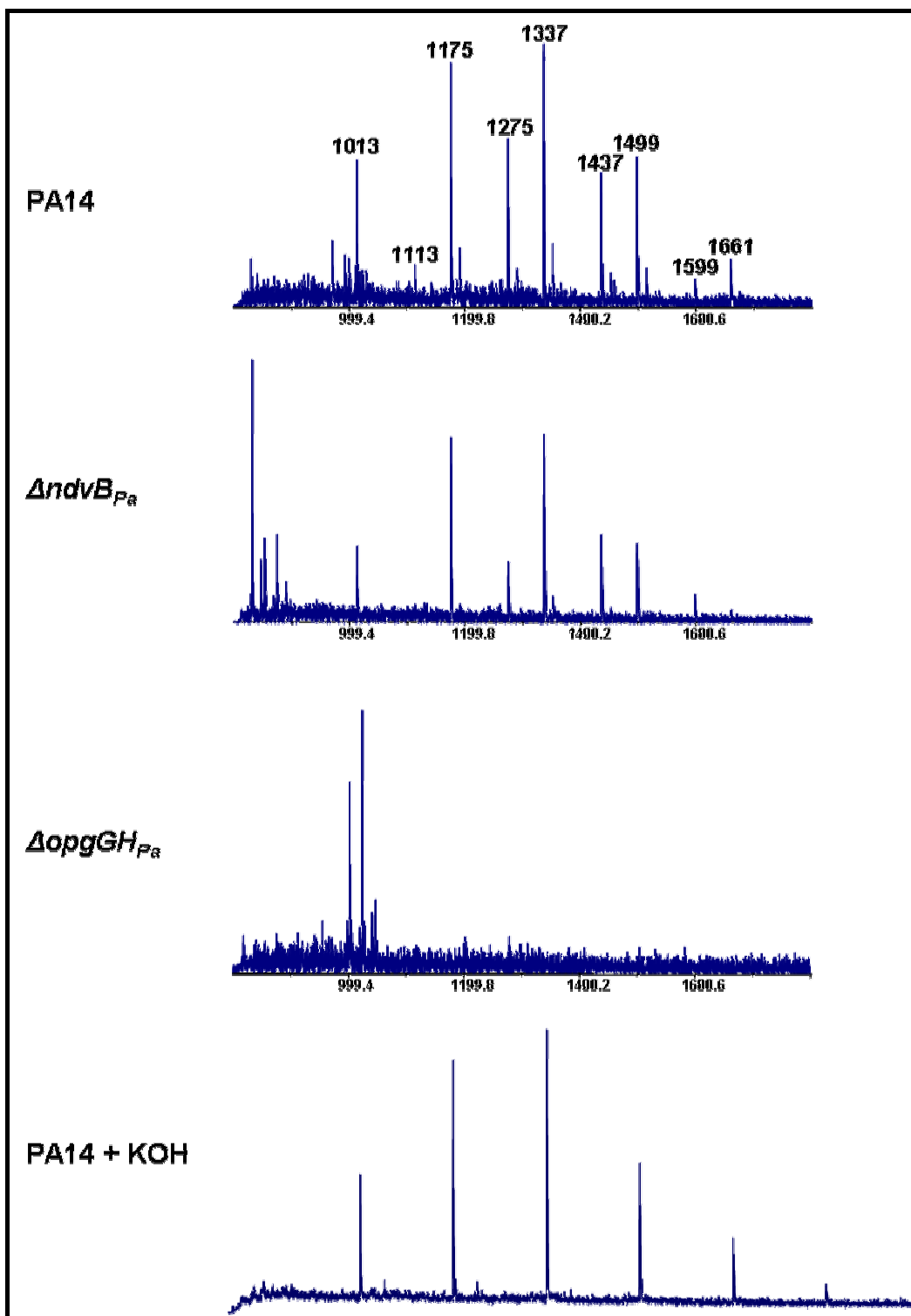


Figure II-I-2 : Spectres de masse MALDI obtenus en mode positif : spectres MALDI des OPG non désubstitués des souches PA14, $\Delta ndvB_{Pa}$, $\Delta opgGH_{Pa}$, et des OPG traités à l'hydroxyde de potassium (KOH) de la souche sauvage PA14.

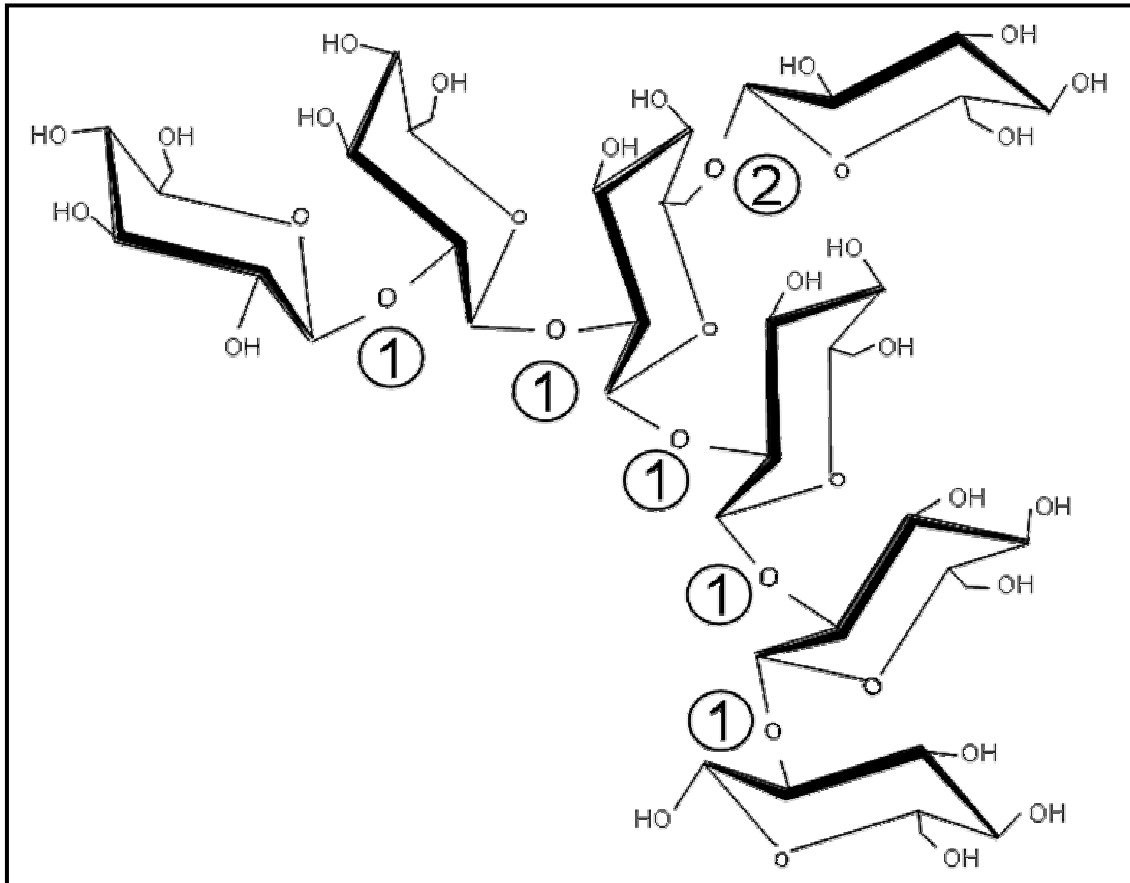


Figure II-I-3 : Proposition de structure du squelette glucosidique pour une molécule moyenne d'OPG chez *P. aeruginosa*. 1 et 2 représentent respectivement les liaisons β -1,2 et β -1,6.

5. Impact des OPG sur la formation des biofilms

Cette expérience a été réalisée par Yannick Lequette. La formation des biofilms a été observée en flux continu de nutriment sur une période de 5 jours. Les bactéries, marquées par une sonde GFP ou RFP, sont inoculées en parallèle dans deux chambres fermées par une lame de verre sur laquelle vont se former les biofilms. Un microscope confocal à balayage laser sera utilisé pour l'observation et la prise d'images.

Après 24h d'incubation, dans le cas du sauvage PA14, des cellules individuelles et des amas de cellules sont observées sur toute la surface du verre. Le mutant $\Delta opgGH_{Pa}$ est capable de coloniser de manière aussi efficace cette surface. Au bout de 48h, le sauvage PA14 forme des microcolonies. Ce sont ces microcolonies qui sont à la base de la formation des biofilms. Aucune microcolonie n'est retrouvée dans le cas du mutant $\Delta opgGH_{Pa}$. Au bout du 3^{ème} jour, les microcolonies du sauvage PA14 continuent de croître et forme un biofilm de 25 μm d'épaisseur en moyenne. Le biofilm couvre l'intégralité de la surface de verre. Pendant le 4^{ème} et 5^{ème} jour, le biofilm de la souche sauvage continue sa maturation en structure de type «mushroom» caractéristique des biofilms matures de *P. aeruginosa*. Dans le cas du mutant $\Delta opgGH_{Pa}$, les microcolonies n'apparaissent qu'au bout du 3^{ème} jour. Le biofilm reste bloqué à cette étape et est incapable d'arriver à maturation, ce mutant est incapable de former des structures de type « mushroom » (Figure II-1-4).

Dans le cas du mutant $\Delta ndvB_{Pa}$, la formation des biofilms est aussi affectée. Ce mutant a un comportement similaire à $\Delta opgGH_{Pa}$. Il est incapable de former des biofilms matures et s'arrête au stade des microcolonies (Figure II-1-4).

Le logiciel Comstat v.1 software (Heydorn et al. 2000) a été utilisé pour confirmer les résultats obtenus aux jours J3 et J5 par l'observation au microscope confocal à balayage laser (résultats non montrés).

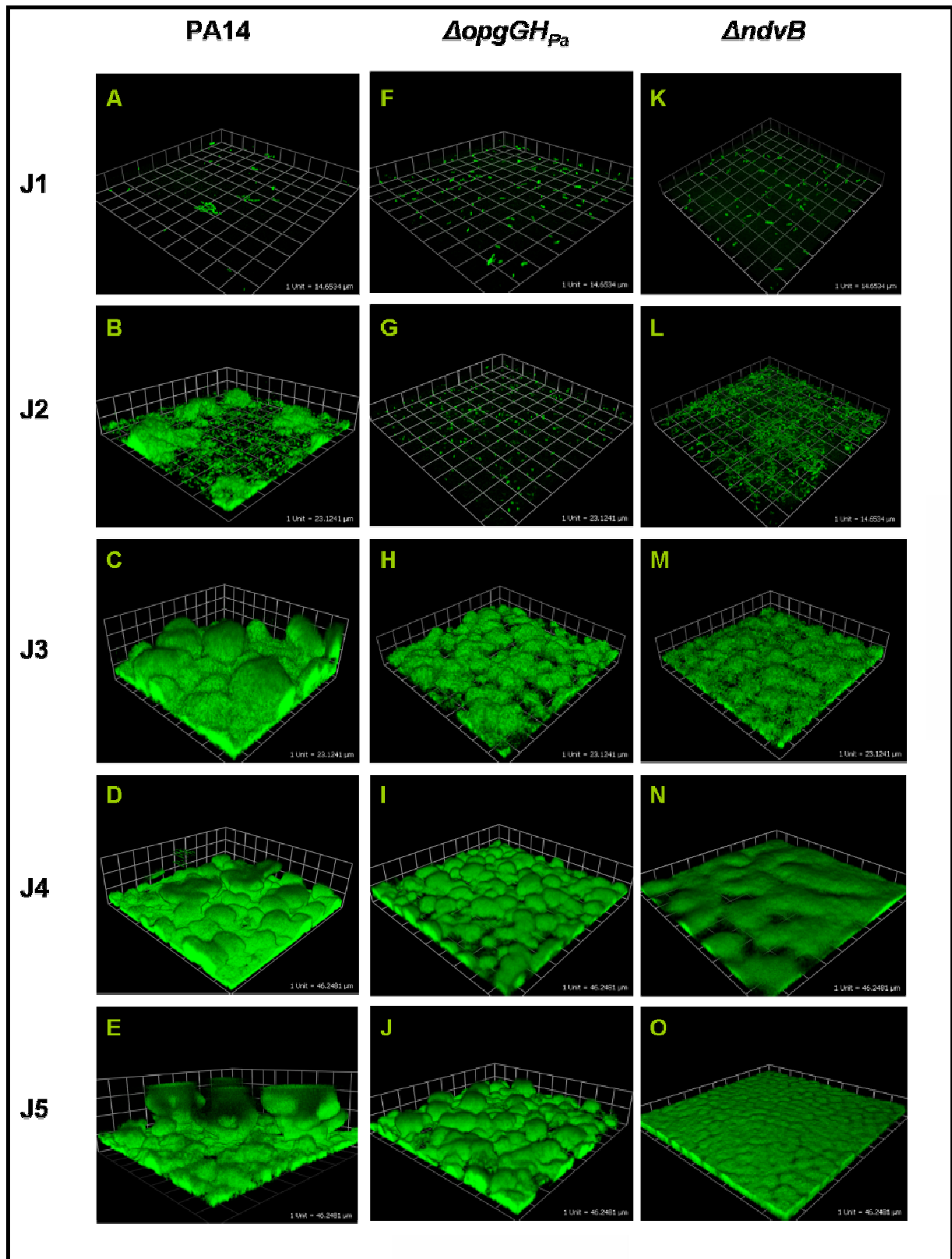


Figure II-I-4 : Formation des biofilms sur une période de 5 jours (J1-J5) des souches PA14, $\Delta opgGH_{Pa}$ et de $\Delta ndvB_{Pa}$. Une unité de quadrillage représente respectivement 14 μ m, 23 μ m, 46 μ m pour les groupes d'images (A, F, K), (B, C, G, H, L, M) et (D, E, I, J, N, O).

6. Complémentation de la délétion *opgGH*

Pour confirmer qu'une intacte copie de l'opéron *opgGH_{Pa}* est nécessaire à la synthèse des OPG et à la maturation complète des biofilms, Yannick Lequette a construit le plasmide pYL205 contenant l'intégralité de l'opéron *opgGH_{Pa}* de PA14 et 1580 pb en amont du codon d'initiation d'*opgG_{Pa}*. Ce plasmide a été utilisé pour transformer le mutant Δ *opgGH_{Pa}* donnant ainsi la souche pYL205/ Δ *opgGH_{Pa}*. Il n'y a pas de différences de croissance entre la souche sauvage et pYL205/ Δ *opgGH_{Pa}*.

L'introduction de l'opéron *opgGH_{Pa}* grâce à un plasmide multicopie dans le mutant Δ *opgGH_{Pa}* restaure la synthèse d'OPG. De plus celle-ci est augmentée d'un facteur 8-10 (Figure II-1-5). L'analyse en spectrométrie de masse MALDI en mode positif des OPG non désubstitués synthétisés par pYL205/ Δ *opgGH_{Pa}* révèle un profil similaire obtenu dans le cas de la souche sauvage. On retrouve les 5 ions $[M + Na]^+$ de rapport m/z 1013, 1175, 1337, 1499 et 1661 correspondant à des hexoses linéaires dont le degré de polymérisation varie de 6 à 10 résidus avec un maximum de 7-8. La structure du squelette des OPG est identique dans la taille et l'hétérogénéité. On peut noter également la présence des 4 ions $[M + Na]^+$ de rapport m/z 1113, 1275, 1437 et 1599 correspondant à des OPG substitués par des résidus esters de masse moléculaire 100 Da (Figure II-1-6). L'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse des dérivés partiellement méthylés et acétylés montre que la nature et la proportion des liaisons glucosidiques sont également similaires à celle de la souche sauvage.

La formation des biofilms de Δ *opgGH_{Pa}* complémenté a été également réalisée en flux continu de nutriment comme décrit précédemment. Au 5^{ème} jour, la morphologie et la quantification des biofilms synthétisés par Δ *opgGH_{Pa}* complémenté avec pYL205 montre une structure similaire aux structures de type « mushroom ». Ces structures ne sont pas autant abondantes que dans le cas de la souche sauvage PA14. L'introduction de l'opéron *opgGH_{Pa}* sur un plasmide multicopie dans notre mutant Δ *opgGH_{Pa}* restaure la capacité à former des biofilms matures mais différents des biofilms observés dans le cas de la souche sauvage.

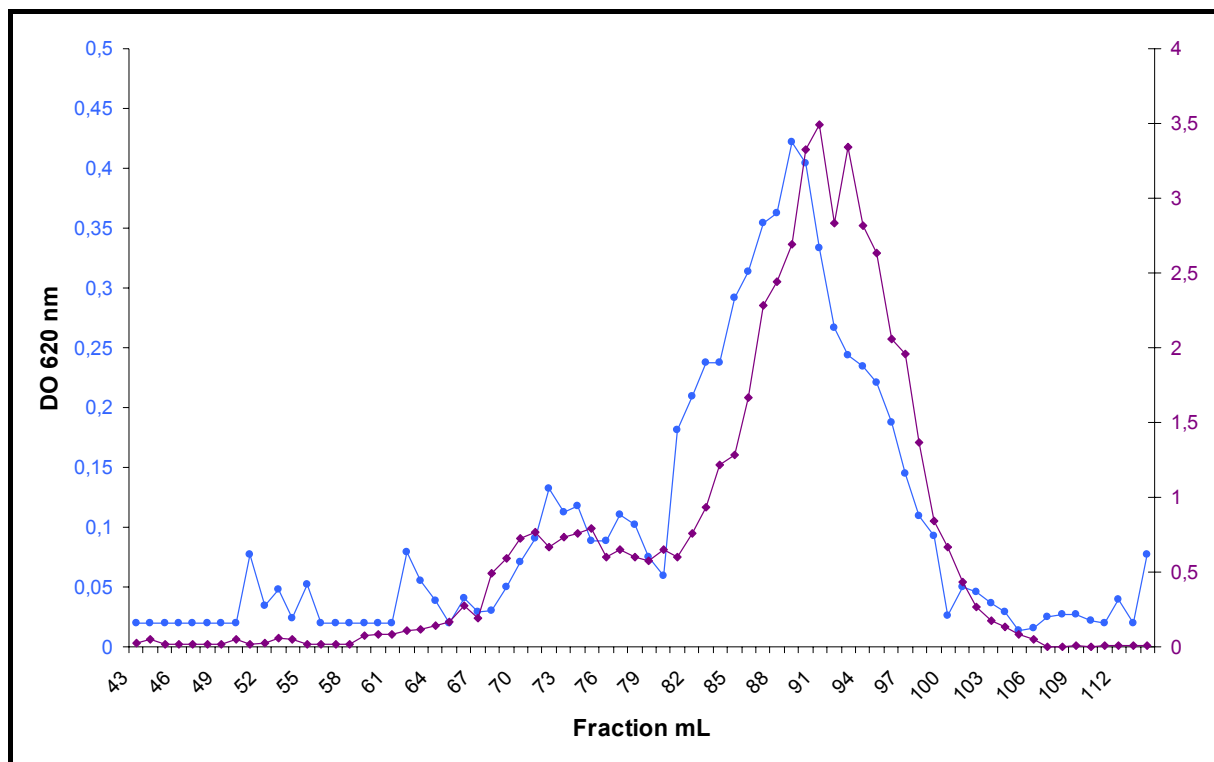


Figure II-I-5 : Chromatographie de filtration sur gel P6 : En abscisse, chaque fraction correspond à 1 mL collectés à 10 mL/h. En ordonnée est indiquée la densité optique à 620nm obtenue lors du dosage des oses neutres à l'anthrone sulfurique. -○- ; -◇- correspondent respectivement à PA14, et pYL205 / Δ opgGH_{Pa}.

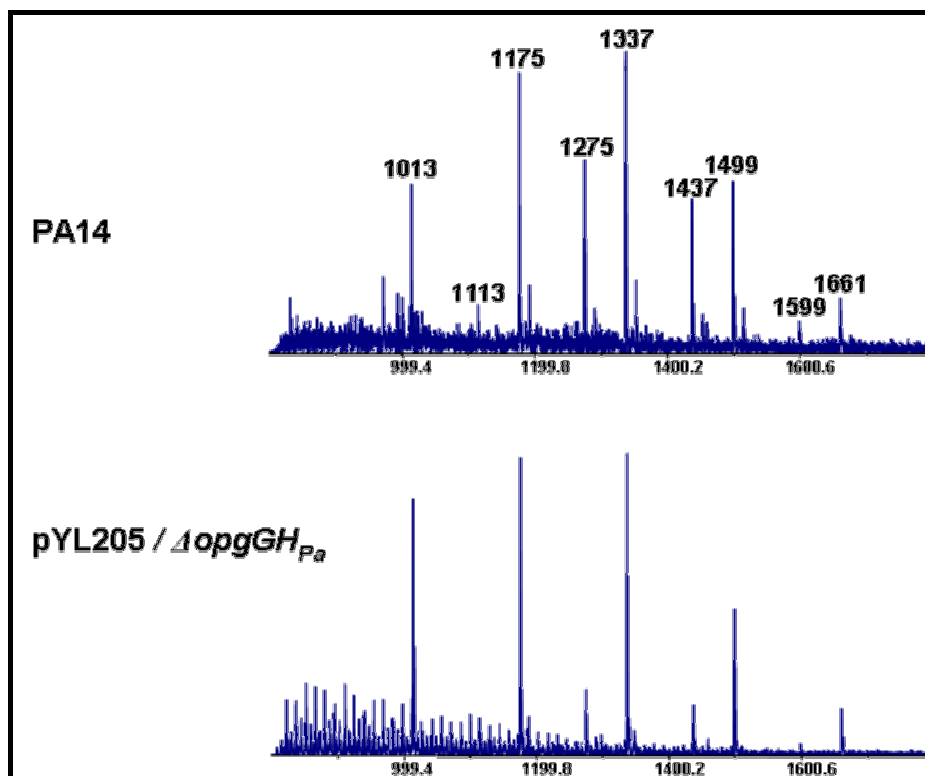


Figure II-I-6 : Spectres de masse MALDI obtenus en mode positif : spectres MALDI des OPG non désubstitués des souches PA14 et pYL205 / Δ opgGH_{Pa}.

7. Discussion

P. aeruginosa présente dans son génome deux locus qui peuvent potentiellement intervenir dans la biosynthèse des OPG. Le gène *ndvB_{Pa}* présente 58% d'identité avec le gène *ndvB_{Bj}* de *B. japonicum*. *NdvB_{Bj}*, est classée dans la famille des glycosyl-hydrolase GH17 et participe à la synthèse de glycanes cycliques composés de résidus de glucose liés en β -1,3. Le locus *opgGH_{Pa}* est aussi un bon candidat puisqu'il code des protéines qui présentent 82% et 74% de similitude avec les protéines OpgG et OpgH, une glycosyltransférase de type 2, d'*E. coli*. Une interruption de chacun de ces gènes par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique a permis de montrer que l'opéron *opgGH_{Pa}* était responsable de la synthèse de glucanes linéaires similaires à ceux d'*E. coli* et de *P. syringae*.

Les profils obtenus lors des purifications par chromatographie de filtration sur gel ne montrent aucune différence entre les produits extraits de la souche sauvage PA14 et du mutant Δ *ndvB_{Pa}*. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de Mah et collaborateurs (2003) qui publient que le gène *ndvB_{Pa}* est responsable de la biosynthèse des OPG chez *P. aeruginosa*. Nous avons utilisé au départ la même technique de purification de ces molécules, à savoir une chromatographie de filtration sur gel. Pourtant les profils obtenus sont totalement différents. Mah et collaborateurs montre la présence d'un composé réagissant à l'antrone sulfurique qui est absent dans le cas du mutant Δ *ndvB_{Pa}*. Cependant le dosage à l'antrone ne semble pas significatif puisque les densités optiques maximales observées pour le composé synthétisé par la souche sauvage ne dépasse pas 0,1. Ce dosage n'est pas suffisamment sensible pour observer réellement des différences. Il n'est pas impossible que ce produit soit également présent dans le mutant Δ *ndvB_{Pa}*. Une chromatographie HPEA/PAD (high performance anion exchange chromatography pulsed amperometric detection) leur a permis de montrer que le composé était uniquement constitué de molécules de glucose. Cependant ils lui attribuent le terme « d'OPG » uniquement en se référant à leur étalon constitué des OPG cycliques de *Sinorhizobium meliloti*. Nous n'avons pas réussi à identifier les glucanes potentiellement cycliques que Mah et collaborateurs (2003) avaient isolés. Les profils de spectrométrie de masse ne montrent aucune différence entre la souche sauvage

et le mutant $\Delta ndvB_{Pa}$ et cela sur un large spectre de masse puisque nous avons approfondis nos recherches pour des masses comprises entre 2300 et 5000 Da. Nous n'avons identifié aucune molécule cyclique. Nous n'avons pu identifier le produit issu de l'expression du gène $ndvB_{Pa}$. Nous ne pouvons pas exclure l'idée que ce gène soit responsable de la synthèse en très faible quantité d'autres oligosaccharides. Nous ne pouvons pas exclure non plus que le produit de $ndvB_{Pa}$ soit une enzyme de dégradation.

Le travail réalisé ici avait pour but de déterminer la structure des OPG synthétisés par *P. aeruginosa* et de compléter l'étendue de nos connaissances sur la diversité de ces molécules. Cette bactérie synthétise des OPG associés à la cellule appartenant à la famille I. Ces OPG constituent une famille hétérogène d'oligosaccharides dont le degré de polymérisation varie de 5 à 10 résidus. Le squelette glucaniques ressemble fortement à celui retrouvé chez *P. syringae*, *E. chrysanthemi* et *E. coli*. On retrouve des résidus de glucose liés en 1,2 avec des branches en 1,6. Néanmoins, il persiste quelques différences. En moyenne, le squelette des OPG de *P. aeruginosa* est plus court. Le degré de polymérisation moyen est situé à 7-8 résidus de glucose alors qu'il est situé à 8-9 résidus de glucose dans le cas de *E. coli*. Aussi les OPG de *P. aeruginosa* sont relativement moins branchés. En effet, chez *P. aeruginosa* les OPG sont constitués en moyenne de 12% de point de branchement alors que dans le cas des OPG de *E. coli* les OPG sont constitués en moyenne de 24% de point de branchement. Les protéines OpgG et OpgH sont responsables de la biosynthèse du squelette glucanique chez ces deux espèces. On peut penser que ces protéines partagent les mêmes fonctions chez *P. aeruginosa* et *E. coli* mais leur cinétique de réaction ou leur affinité avec leur substrat est vraisemblablement différente. Finalement la substitution des ces molécules représente la grande différence qui permet de distinguer les OPG de cette même famille. Chez *E. coli*, les OPG sont substitués par des groupements de phosphoglycérol, de phosphoéthanolamine et de succinate. Les OPG d'*E. chrysanthemi* possèdent sur leurs branches des résidus succinate et acétate. Par contre, les OPG de *P. syringae* sont dépourvus de substitution. Dans ce travail nous avons montré que *P. aeruginosa* synthétise des glucanes substitués par des résidus ester de masse moléculaire 100 Da. Il peut s'agir vraisemblablement de résidus succinyle bien que le méthylmalonyle soit aussi une possibilité. La diversité des ces substituants nous amène à poser la question

suivante : la substitution contribue-t-elle à la spécificité du rôle des OPG chez ces différentes espèces ? Quelques expériences ont été réalisées au laboratoire. Gilles Boussemart dans son Master recherche a apporté le gène *opgB* d'*E. coli* chez *E. chrysanthemi* grâce à l'utilisation d'un mini transposon : l'apport des substituants phosphoglycérol et la modification de la charge des OPG d'*E. chrysanthemi* ne modifie pas la virulence de cette bactérie sur les feuilles d'endives et la tubercule de pomme de terre. Par contre, *E. chrysanthemi* semble devenir plus résistante aux sels biliaires.

L'interruption du locus *opgGH_{Pa}* chez *P. aeruginosa PA14* a un effet dramatique sur la pathogénicité de cette bactérie. Un tel mutant devient incapable d'infecter *A. tumefaciens* et d'induire la mort chez le nématode *C. elegans* et chez la souris (Mahajan-Miklos et al. 1999). *P. aeruginosa*, pathogène puissant responsable de nombreuses maladies nosocomiales, a beaucoup été étudié pour sa capacité à développer des biofilms. Ces biofilms représentent une structure très organisée qui exprime de nombreux facteurs de virulence et qui sont aussi capables de développer une très grande résistance aux agressions extérieures. L'un des objectifs de ce travail était de voir un éventuel impact des OPG sur la formation des biofilms. Le développement des biofilms a été observé en flux continu de nutriment sur une période de 5 jours. Il apparaît clairement que le mutant Δ *opgGH_{Pa}* est capable de coloniser une surface et de former des microcolonies. Pour appuyer ce résultat, ce mutant a une motilité équivalente à la souche sauvage (données non montrées). Il est capable de nager, la synthèse des flagelles n'est donc pas perturbée et il réalise le phénomène de motilité par trépidation prouvant ainsi l'efficacité des pilis de type IV. Par contre cette mutation a un effet néfaste sur la maturation des biofilms. Les biofilms sont bloqués au stade microcolonie, ils sont incapables de développer les structures de type « champignons ». Bien que leur structure soit fortement affectée, ces biofilms ne semblent pas affectés dans leur résistance aux antibiotiques (données non montrées).

Les OPG synthétisés par *P. aeruginosa* sont osmorégulés. L'augmentation de l'osmolarité du milieu par ajout de saccharose ou de NaCl réduit jusqu'à 5 fois l'expression de l'opéron *opgGH_{Pa}* (données non montrées). La formation des biofilms dans un contexte sauvage ou mutant est alors très perturbée. Les étapes de

maturation ne sont pas réalisées. Les OPG semblent nécessaire à la formation des biofilms de *P. aeruginosa* dans un milieu de basse osmolarité.

Comment les OPG influent sur la formation des biofilms ? Les OPG sont des oligosaccharides de taille limitée. Ils pourraient jouer le rôle d'une molécule signal. La formation des biofilms fait intervenir les systèmes détecteurs de quorum LasI/LasR et RhII/RhIR. L'expression de ces protéines sont elles même sous le contrôle de systèmes à phosphorelais comme PprB/PprA (Dong et al. 2005), SadRAS (Kuchma 2005), GacS/GacA ou plus récemment RetS/GacA et LadS/GacA (Ventre, 2006). Dans ces trois derniers systèmes, le capteur situé dans la membrane interne perçoit un signal vraisemblablement périplasmique, qu'il transmet par phosphorelais au régulateur cytoplasmique GacA. La balance GacA/GacA-P permettra d'activer ou réprimer les gènes *lasI* et *rhII*. Les capteurs de la membrane interne, RetS et LadS, ont la particularité de posséder un domaine périplasmique de type CBP (carbohydrate binding protein). Les auteurs proposent que le signal perçu soit dû à l'interaction avec des oligosaccharides périplasmiques à ce jour inconnu (Ventre et al. 2006). Plusieurs liens ont déjà été observés entre les OPG et les systèmes à phosphorelais chez certaines espèces de la famille I. Tout d'abord chez *E. coli*, Ebel et collaborateurs (1997) proposent que les OPG agissent comme molécules signal du système Rcs pour contrôler l'expression des gènes *cps* responsables de la production des exopolysaccharides constituant la capsule. Chez *E. chrysanthemi*, Franck Bouchart (2006), dans sa thèse, a isolé une mutation suppressive du phénotype pleiotrope d'un mutant *opgG*. Cette mutation est située dans le gène *rscC* codant le capteur membranaire dans le système RcsCD/B. Les OPG sont de bons candidats pour des molécules signal situées dans le périplasme. Chez *P. aeruginosa*, la délétion de ces systèmes à phosphorelais ne perturbe ni la motilité, ni l'initiation des biofilms. Par contre, la maturation des biofilms est fortement perturbée (Kuchma et al. 2005). Etant donné les similitudes observées avec le mutant $\Delta opgGH_{Pa}$ dans la formation des biofilms, il serait intéressant d'étudier l'impact des OPG sur les systèmes à phosphorelais de *P. aeruginosa*.

Partie II : Relation Structure-Fonction des protéines périplasmiques OpgG et OpgD

Le gène *opgG* code une protéine périplasmique sécrétée par le système Sec. Cette protéine est indispensable à la synthèse des OPG puisque l'interruption du gène *opgG* entraîne une absence de synthèse de ces molécules glucaniques. La fonction réelle de cette protéine au sein du complexe multienzymatique n'a pas encore été élucidée. En effet, la séquence primaire d'OpgG ne possède pas d'orthologues conservés dans les banques de données et cela rend difficile l'attribution d'un rôle biologique de cette protéine. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la synthèse du squelette glucanique, on pense qu'elle serait responsable de la formation des branches.

La publication de la séquence du génome d'*E. coli* a permis d'identifier un gène paralogue d'*opgG*, *opgD* situé à 32,2 min sur le chromosome. Le produit du gène *opgD* présente 37,6% d'identité et 53,5% de similitude sur 484 résidus alignés avec OpgG (Figure II-II-1). *opgD* code une protéine sécrétée dans le périplasma par le système de sécrétion Tat (Lequette et al. 2004). OpgD n'est pas indispensable à la synthèse des OPG mais son absence provoque la synthèse d'OPG de degré de polymérisation plus grand et relativement moins branchés.

Etant donné les fortes similitudes en séquence des protéines OpgG et OpgD, il nous a paru intéressant de déterminer et de comparer la structure tridimensionnelle de ces deux protéines afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le rôle d'OpgG et d'OpgD au sein du complexe multienzymatique. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les équipes de Guy Lippens et Vincent Villeret.

Nous avons également envisagé plusieurs stratégies de mutagenèse afin de trouver des mutants d'*opgG* altérés dans leur fonction. Dans un premier temps, nous avons réalisé de la mutagenèse localisée par PCR dégénérée. Un crible basé sur le marquage spécifique des OPG au 2-[³H] glycérol et au D-U-[¹⁴C] glucose nous a permis d'isoler un mutant intéressant. L'obtention de la structure tridimensionnelle

d'OpgG a permis également de réaliser de la mutagenèse dirigée et de la mutagenèse par délétion. Nous avons pu ainsi isoler les premiers mutants d'*opgG* dont le produit participe à la synthèse d'OPG de structure modifiée.

| | | |
|------|---|-----|
| OpgD | FSI..LQSMADLAQTAWRGAPRPLPDTLATMTPOAYNSIQYDAEKSLMHNVENRQLDAQFFHMGMGFRRRRVRMFSDPA | 92 |
| | FSI . A. LA : LP . M Y IQ:: :K. W.N.. . :F:H GM F V:: V A | |
| OpgG | FSIDDVAKQAQSLAGKGYETPKSNLPSVFRDMKYADYQQIQFNHDKAYWNLKT.PFKLEFYHQGMFYDTPVKINEVT.A | 78 |
| OpgD | THLAREIHFRPELKYNDAGVDTKQLEGQSDLGFAGFRVFKAPELARRD..VVSFLGASYFRAVDDDTYQYGLSARGLAID | 170 |
| | T . R I : P : F : D D .. DLGFAGF:V. :: :VS LGASYFR : YGLSARGLAID | |
| OpgG | TAVKR.IKYSPTYFTFGDVQHDKDVK..DLGFAGFKVLYPINSKDKNDEIVSMGLGASYFRVIGAGQVYGLSARGLAID | 154 |
| OpgD | TYTDSKEEFPDFTAFWFDIVKPGATFTVYALLDASITGAYKFTIHCEKSKVIMDVENHLYARKDIKQLGIAPMTSMFS | 250 |
| | T S EEP F FW : KP .T:YALLD S TGAYKF : V: DV: . : Y R : : LG:AP:TSMF | |
| OpgG | TALPSGEEFPRFKEFWIERPKPTDKRLTIYALLDSPRATGAYKVVVMPGRDVTV.DVQSKIYLRDKVGLGVAPLTSMFL | 223 |
| OpgD | CGTNERMCDTIHPQIHDSDRLSMWRGNGEWICRPLNPNQKLOFNAYTDNPKGFGLLQLDRDFSHYQDIMGWINKRPSL | 330 |
| | G N: : P::HDS: LS: GNGEWI RPLNPN: L ...: NP:GFGLLQ RDFS ::D: Y: RPS | |
| OpgG | FGPNQPSANNYRPELHDSNGLSIHAGNGEWIWRPLNPNPKHLAVSSFSMENPQGFGLLQGRDRDFSRFEDLDDRYDLRPSA | 313 |
| OpgD | WVEPRNKWKGKIGIMEIPTTGEILDNIVCFWQPEKAVKAGDEFQYRLWSA.QPPVHCPL.ARVMATRGMGGFSEG | 408 |
| | WV P: .WKG:: L.EIPT ET DNIV :W P:: . G E F:Y : .S : .H P A V TR G : | |
| OpgG | WTPKGEWKGVELVEIPTNDEINDNIVAYWTPDQLPEPGKEMNFKYITIFSRDEDKHLAPDNAWVQQTRRSTGDKVQS | 393 |
| OpgD | WAPGEHYPEKWARRFAVDFVGGDLKAAAPKGIPEPVITISS...GEAKQIILYIEPIDGYRIQFDWYPTSDSTDPVDMR | 484 |
| | : P: F VDF G ::K P. PV :S GE : : Y G:R: D. :NR | |
| OpgG | NLIHQ..PDGTIA.FVWDFTGAEKKL.PEDT.PVTAQTSIGDNGEIVEIVRYNPVTKGRLVMR.VKVKDAKKTTEMR | 467 |
| OpgD | MYLRCQGDALSETWLYQ | 501 |
| | L :SETW YQ | |
| OpgG | AALVNAVQDTLSETWSYQ | 484 |

Figure II-II-1 : Alignement des séquences primaires d'OpgG et d'OpgD d'*E. coli*

1. Stratégie de purification et de cristallographie des protéines OpgG et OpgD

1.1. Purification des protéines OpgG et OpgD

Les purifications des protéines OpgG et OpgD ont été réalisées en collaboration avec Xavier Hanouille. Ces deux protéines ont été purifiées dans les mêmes conditions. La purification d'OpgG a été réalisée et décrite par Xavier Hanouille dans sa thèse (2004). Nous prendrons ici l'exemple de la protéine OpgD.

Le gène *opgD* amplifié par PCR a été introduit dans le vecteur pET-24 d (+) (Novagen) (voir annexe 1) entre les sites de restriction *NcoI* et *XhoI*. Le gène recombinant est ainsi sous le contrôle du promoteur du phage T7 et inducible par l'IPTG. Cette construction permet l'expression cytoplasmique d'une protéine de 528 acides aminés incluant les résidus 33-351 du précurseur sauvage, une méthionine initiateur en position Nter et une étiquette poly His en Cter de 8 résidus LEHHHHHH. Ce plasmide a été utilisé pour transformer la souche BL21(DE3), qui code l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur *lacUV₅*, donnant la souche NF1658.

5ml de NF1658, en phase stationnaire, ont été utilisés pour inoculer 1L de milieu LB. La croissance bactérienne se fait dans un premier temps sous agitation à 37°C. L'induction par l'IPTG, 0.4mM, final se réalise à une densité cellulaire de 6.10^8 bactéries/mL. Les cellules sont ensuite mises en agitation à 30°C pendant 2h. Les cellules sont centrifugées et stockées à -80°C. Les extraits cellulaires sont préparés avec la méthode de lyse enzymatique utilisant le lysozyme. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et filtration.

La protéine OpgD est purifiée en deux temps. Une chromatographie d'affinité utilisant une colonne de nickel connectée à un système AKTA (Pharmacia) a permis de purifier à 75% la protéine OpgD. Le Nickel immobilisé établit des liens de coordination avec l'étiquette 6-His. Afin d'éviter la précipitation de la protéine, 0,2 mM d'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) et 5 mM de DTT (dithiothreitol) ont été

ajoutés dans chaque fraction. Les fractions contenant OpgD, E3 à E5, ont été rassemblées. Etant donnée la très grande concentration de la protéine, nous avons choisi de la diluer au tiers avant d'effectuer l'étape de dialyse contre un tampon sans sel : 50mM TRIS pH 8.5 0.2mM EDTA et 5mM DTT (Figure II-II-2).

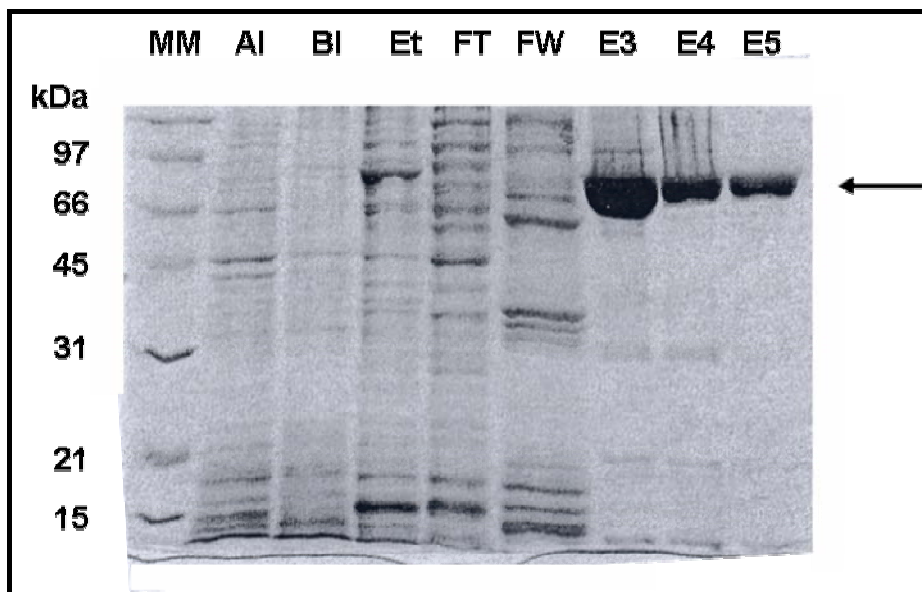


Figure II-II-2 : gel SDS-PAGE montrant le taux de purification d'OpgD suite à la chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel. MM, masse moléculaire ; AI, après induction à l'IPTG ; BI, avant induction à l'IPTG ; Et, échantillon déposé sur colonne de Nickel ; FT, fraction non retenue ; FW, fraction de lavage ; E, fraction d'éluion (55-60 kDa). La flèche noire indique la position d'OpgD purifiée

Une chromatographie échange d'anions (MonoQ HR10/10 Pharmacia) préalablement équilibrée en 50mM TRIS pH 8.5, a été réalisée suivant un gradient continu de NaCl 0-1M, 4mL/min. 5 mM de DTT a été rajouté dans chaque fraction. Les fractions contenant la protéine, E3 à E9 + E11, ont été rassemblées. La protéine OpgD est ainsi purifiée à 90% (Figure II-II-3).

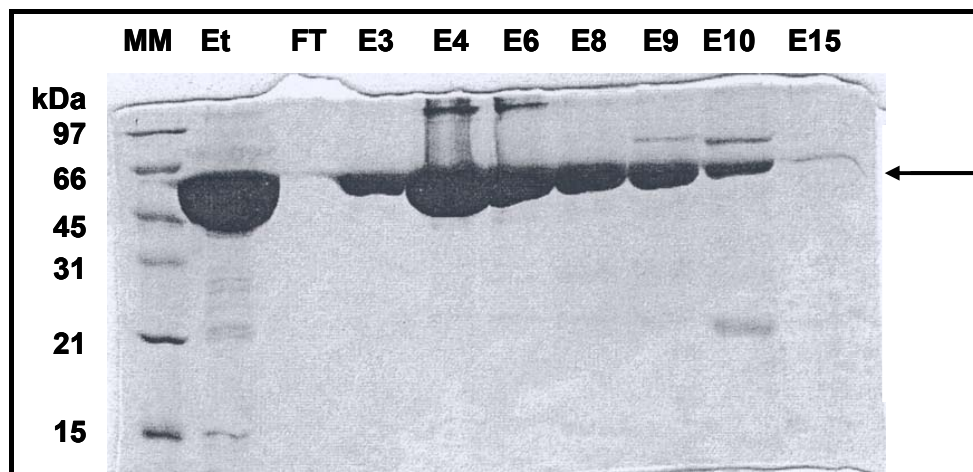


Figure II-II-3 : gel SDS-PAGE montrant le taux de purification d'OpgD suite à la chromatographie échange d'anions. MM, poids moléculaire ; Et, échantillon déposé sur colonne ; FT, fraction non retenue ; E3 à E15 (55-60 kDa), fractions d'élution selon un gradient continu de NaCl 0-1M. La flèche noire indique la position d'OpgD purifiée.

La protéine est ensuite dialysée contre un tampon Tris 50mM, NaCl 30mM, DTT 2mM puis concentrée à l'aide d'un concentrateur à membrane tangentielle. Ces étapes ont permis de purifier environ 70 mg de la protéine OpgD à une concentration finale de 17mg/mL. Des aliquots de 200µL sont conservés à 4°C.

1.2. Cristallographie des protéines OpgG et OpgD

1.2.1. Cristallographie et détermination de la structure de la protéine OpgG

La structure tridimensionnelle de la protéine OpgG (PDB : 1TXK) réalisée par Xavier Hanouille au cours de sa thèse nous a aidé dans la compréhension de l'activité de cette protéine. Cette structure a été résolue par cristallographie en utilisant la méthode MAD (Multiwavelength Anomalous Diffraction). Le modèle moléculaire a été construit avec une résolution de 2,5 Å.

La détermination de la structure tridimensionnelle a fait l'objet d'un article (voir annexe 2) :

Hanouille X., Rollet E., Clantin B., Landrieu I., Ödberg-Ferragut C., Lippens G., Bohin J.-P. and Villeret V. 2004. Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of Osmoregulated Periplasmic Glucans, J. Mol. Biol. 342: 195-205.

1.2.2. Cristallographie de la protéine OpgD

1.2.2.1. Stratégie envisagée

La détermination de la structure tridimensionnelle de cette protéine est un projet réalisé en collaboration avec Bernard Clantin et Vincent Villeret à l'Institut de Biologie de Lille. Etant donné les fortes similitudes en séquence des protéines OpgG et OpgD, nous avons opté pour la technique de remplacement moléculaire. Deux éléments seront nécessaires pour obtenir une carte de densité électronique par la transformée de Fourier : l'amplitude des facteurs de structure atomique et la phase de réflexion. La diffraction des rayons X par le cristal donnera les intensités de toutes les réflexions. Nous pourrons en déduire l'amplitude des facteurs de structures atomiques. OpgG et OpgD ont une séquence primaire très proche. On peut s'attendre à ce que ces deux protéines aient une structure similaire. Nous utiliserons la phase associée aux coordonnées d'OpgG. L'obtention de cette première carte de densité électronique permettra ainsi d'obtenir la phase d'OpgD. La structure d'OpgD pourra être ensuite déterminée.

1.2.2.2. Obtention des cristaux d'OpgD

La méthode de diffusion en phase vapeur nous a permis d'obtenir des cristaux d'OpgD. Nous avons utilisé la technique de la goutte suspendue (McPherson, 1990) (Figure II-II-4). La goutte est constituée d'un mélange de la protéine et d'une solution tampon avec un agent précipitant. Cette goutte est déposée sur une petite lamelle siliconée qui servira à fermer de façon hermétique le réservoir contenant lui uniquement la solution tampon avec l'agent précipitant. L'équilibre s'établit entre la

goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles jusqu'à ce que la tension de vapeur soit la même dans la goutte et dans le réservoir. La goutte étant au départ plus diluée, cet équilibre va permettre une concentration de cette goutte. La protéine qui ne diffuse pas se retrouve également concentrée. La zone de sursaturation est progressivement atteinte. Cette zone peut-être divisée en trois parties : la zone métastable, la zone de nucléation et la zone de précipitation. C'est dans cette zone que les conditions sont favorables pour l'obtention de cristaux (Figure II-II-5). L'obtention de cristaux d'une protéine va donc dépendre de nombreux paramètres tel que la température, le pH, la force ionique, l'ajout d'additif etc... Il est important de trouver les conditions permettant de s'approcher de la zone de sursaturation sans tomber dans la zone de précipitation.

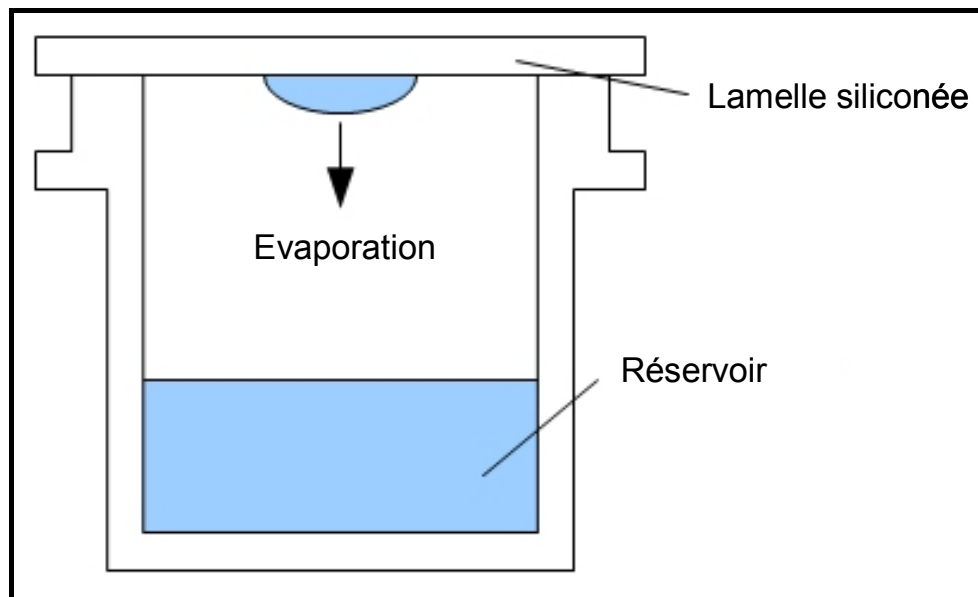


Figure II-II-4 : Technique de la goutte suspendue (McPherson, 1990)

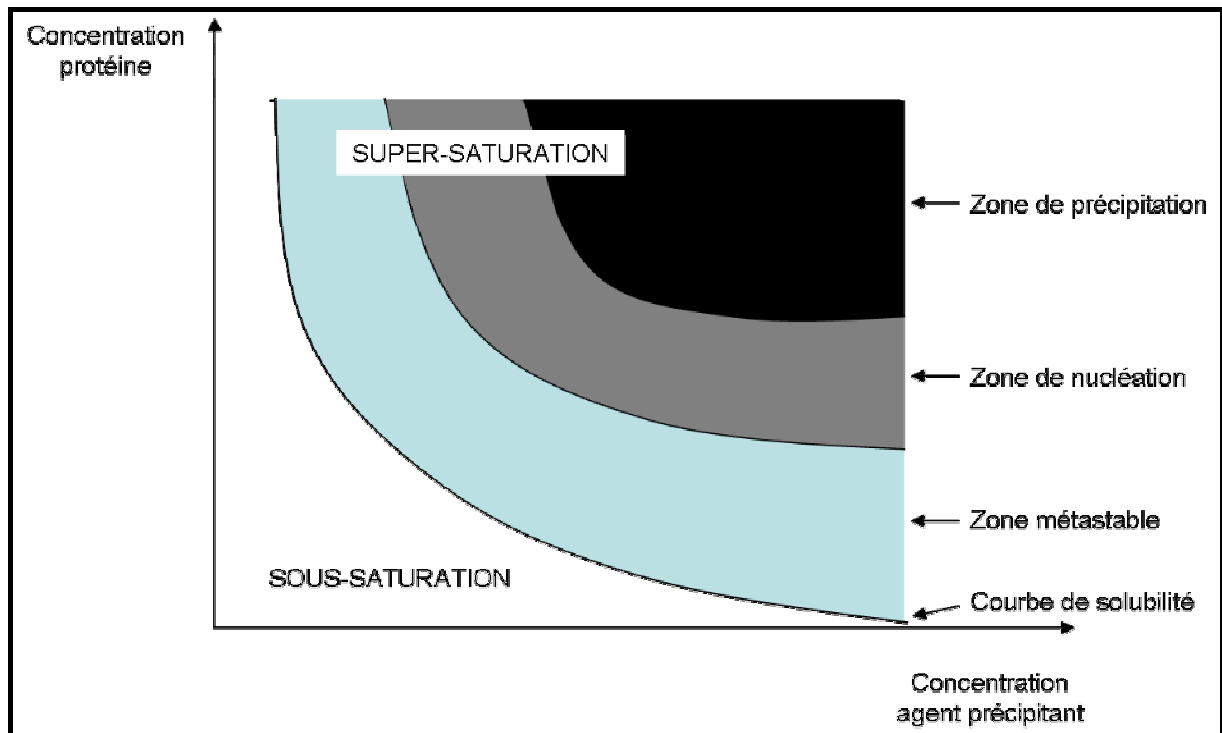


Figure II-II-5 : Diagramme de phase

Plusieurs conditions ont été testées. Le screen Nextal Lite 20°C (kit qui permet de tester 96 conditions avec variation du pH, de l'agent précipitant et de la force ionique) a permis d'obtenir des cristaux de la protéine OpgD. Les conditions obtenues rappellent celles obtenues pour l'obtention des cristaux d'OpgG (PEG 200 52-57%, acétate de sodium 100mM, 0,1 M NaMes (2-morpholino-éthanesulfonate de sodium) pH 6,5 à 20°C) (Hanouille, 2004).

L'ajout de PEG (polyéthylène glycole) 4000 15%, acétate de sodium 200 mM et de Tris-HCl 100 mM pH 8,5 favorise la formation de cristaux plats hexagonaux de la protéine OpgD. De façon à améliorer la structure de ces cristaux, nous avons fait varier les concentrations de ces différents constituants. Différents PEG ont été testés (PEG 550 MME, PEG 1100 MME, PEG 2000 et PEG 6000), le pH a été également modifié (Tris-Cl pH 6,5 ; pH 7,5 et glycine pH 9). La condition PEG 4000 10%, acétate de sodium 200mM et Tris-Cl 100 mM à 20°C favorise l'obtention de cristaux hexagonaux de 200µm X 15µm en trois jours. L'ajout du cryoconservateur glycérol 10% ne perturbe pas la formation de ces hexagones. Néanmoins, ils se forment préférentiellement en présence de PEG 4000 12%.

Ces cristaux sont trop plats pour obtenir une bonne résolution de diffraction aux rayons X. Des cristaux hexagonaux et plus épais ($200\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$) ont été obtenus dans la condition Tris-Cl 100 mM pH 8.5, Acétate de sodium 200 mM, PEG 1000 22% à 20°C (Figure II-II-6). Ces cristaux ont été trempés dans une solution de cryoprotection Tris-Cl 100 mM pH 8.5, Acétate de sodium 200 mM, PEG 4000 32% puis testés sur l'anode tournante. Ces cristaux ont diffracté vers 3.5\AA avec des temps d'exposition de 1hr par image. Une collecte a été réalisée avec une bonne complétude et des statistiques plus ou moins correctes. Toutefois, les essais de remplacement moléculaire avec OpgG n'ont pas abouti. On pense que ceci est dû à la grande taille de la maille ($a = 226.7$, $b = 226.7$, $c = 323.3$, $\alpha = 90.0$, $\beta = 90.0$, $\gamma = 120.0$), qui pose un problème de grands axes.

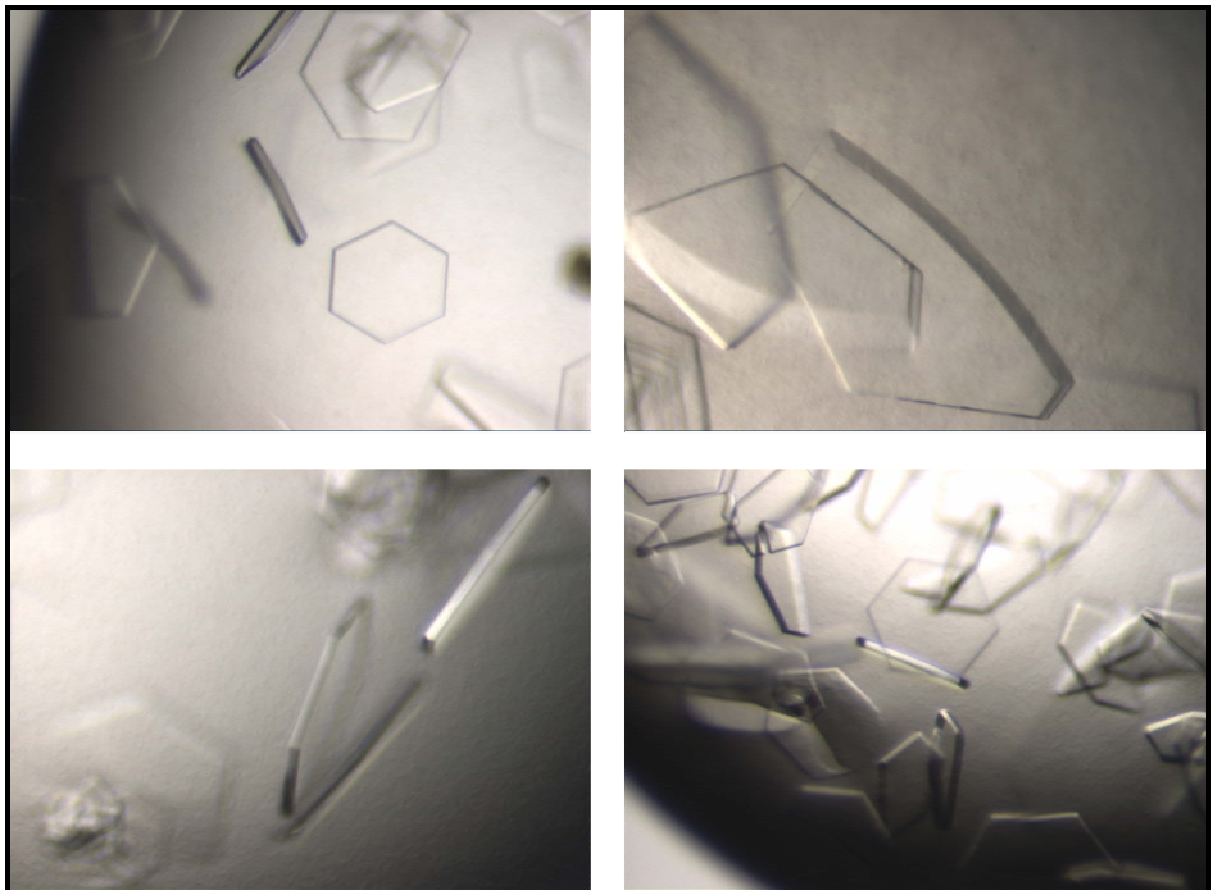


Figure II-II-6 : Photographie de cristaux d'OpgD obtenus dans les conditions de croissance : TRIS-Cl 100 mM pH 8.5, acétate de sodium 200 mM, PEG 1000 22% à 20°C . Ces cristaux sont hexagonaux et ont en moyenne les dimensions suivantes : $200\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$.

2. Détermination de la fonction d'OpgG par mutagenèse.

2.1. Fonction du domaine N terminal

2.1.1. Mutagenèse localisée par PCR dégénérée

2.1.1.1. Stratégie de clonages et criblage des mutants

Des alignements de séquence du gène *opgG* de différentes protéobactéries ont mis en évidence des régions fortement conservées dans le domaine N-terminal. Nous avons ainsi délimité trois zones de faible taille: une zone A de 311 pb, une zone B de 418 pb et une zone C de 329 pb. Chacune de ces zones est bordée par des sites de restriction uniques dans le gène *opgG* qui ont facilité leur amplification par PCR puis le clonage dans le plasmide pNF595 (cf. matériels et méthodes) (Figure II-II-7) (Figure II-II-8).

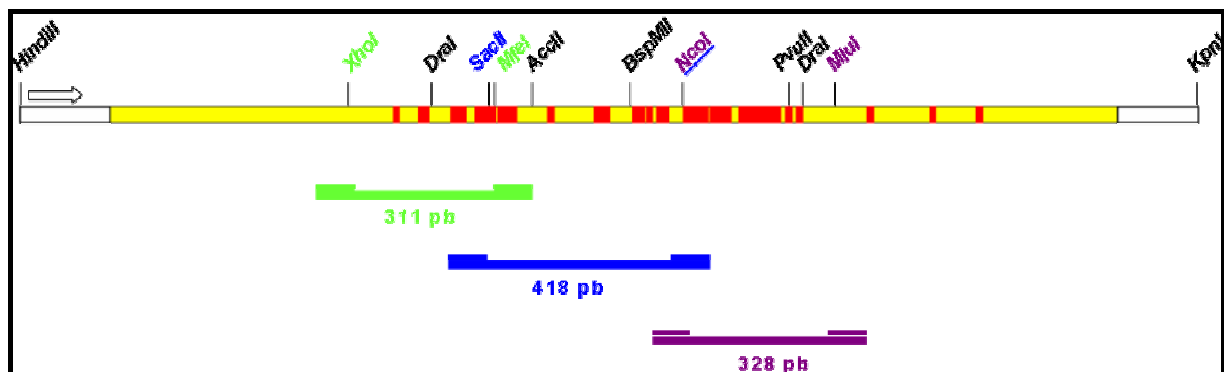


Figure II-II-7: locus du gène *opgG*. Les régions du gène *opgG* conservées chez les protéobactéries sont représentées en rouge. Les différentes zones sélectionnées pour l'amplification par PCR dégénérée sont représentées par des barres horizontales bleue, verte et violette.

Les fragments de 311pb, 418pb et 328pb du plasmide pNF244 (voir matériels et méthodes) ont été amplifiés par PCR dégénérée de manière à introduire une ou deux mutations puis clonés dans pNF595. Les plasmides ainsi obtenus ont été utilisés pour transformer la souche NF702 qui possède une mutation non polaire du gène *opgG* par insertion d'une cassette *neo*. Chaque clone obtenu représente un candidat mutant ayant intégré un fragment amplifié par PCR dégénérée.

Le criblage des mutants a été effectué par incorporation de phosphoglycérol tritié en 2. La démarche utilisée pour le criblage des mutants repose sur l'hypothèse suivante : OpgG est une protéine qui interviendrait dans la formation des branches ; les groupements chargés des OPG tel que le phosphoglycérol étant situés sur le carbone 6 des branches, les clones possédant un marquage diminué par rapport à la souche sauvage seraient susceptibles de ne plus posséder ou de posséder moins de branches et traduiraient la présence d'une mutation sur OpgG. Nous avons retenu les mutants ayant une incorporation intermédiaire de glycérol par rapport à la souche sauvage. Ces mutants peuvent synthétiser des OPG pouvant être classés en trois catégories : des OPG sans branches mais possédant une substitution résiduelle, des OPG possédant moins de branches avec le même degré de polymérisation et des OPG ayant le même taux de substitution mais synthétisés en moindre quantité. Afin d'écarter cette dernière possibilité, nous avons transféré les plasmides dans une souche particulière d' *E. coli* : NF724. Cette souche possède la mutation non polaire d'*opgG* par insertion d'une cassette *neo* et elle possède deux mutations *pgi* et *zwf* l'empêchant d'utiliser le glucose comme source d'énergie. *pgi* est une mutation de la phosphoglucoisomérase qui empêche le passage du glucose-6-phosphate au fructose-6-phosphate donc bloquant la voie de glycolyse. *zwf* est une mutation de la phosphogluco-déshydrogénase qui empêche le passage du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone et bloque ainsi la voie des pentoses. Le seul devenir du D-U-[¹⁴C] glucose est de former de l'ADP-¹⁴C glucose nécessaire à la synthèse du glycogène et l'UDP-¹⁴C glucose nécessaire à la synthèse du LPS et des OPG. Nous avons pu ainsi évaluer la quantité d'OPG synthétisés par un marquage au D-U-[¹⁴C] glucose.

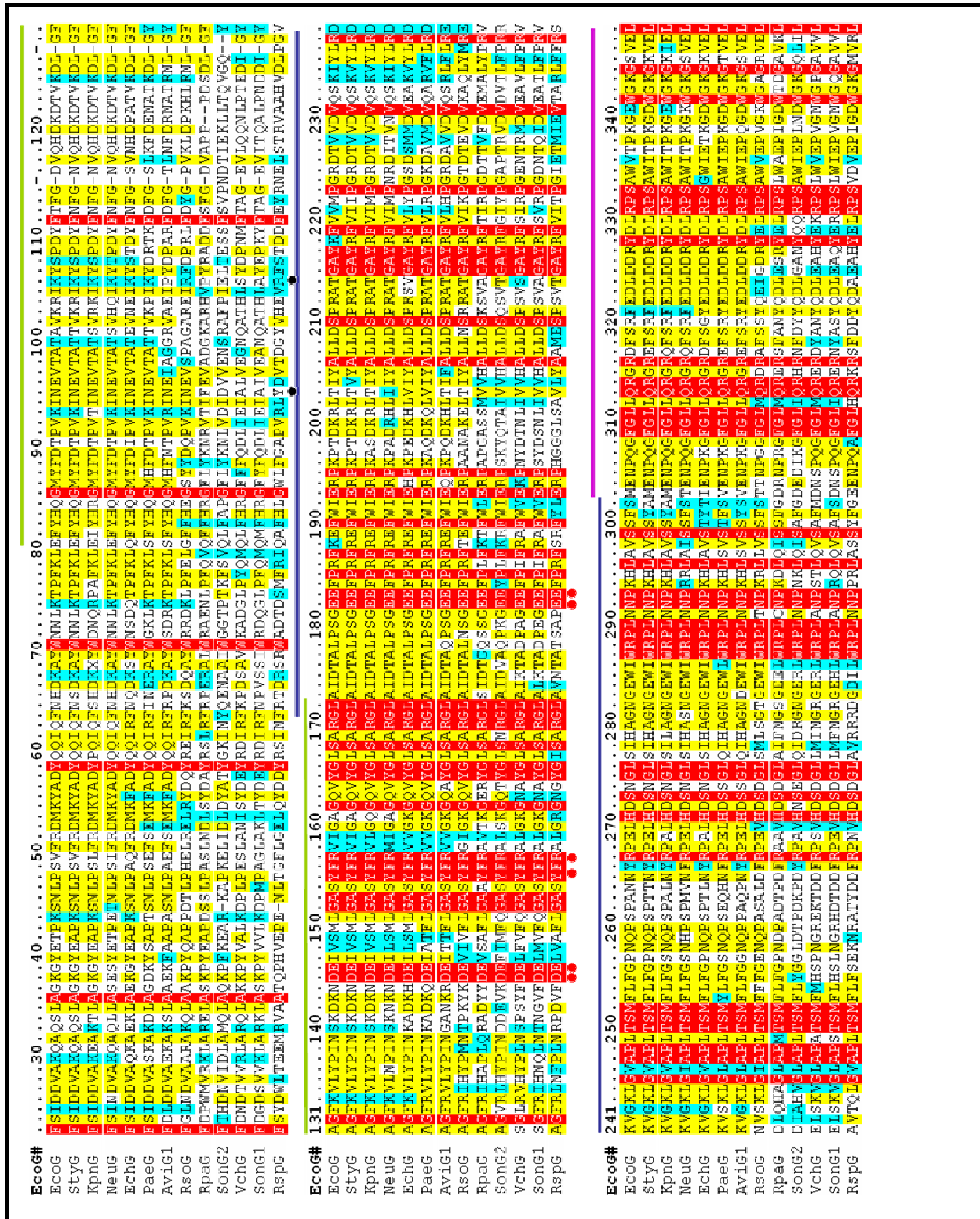


Figure II-II-8 : Alignement de la séquence primaire d'OpgG chez les protéobactéries. AviG1, *Azotobacter vinelandii*; EchG, *Erwinia chrysanthemii*; EcoG, *Escherichia coli* K-12; KpnG, *Klebsiella pneumoniae*; NeuG, *Nitrosomonas europaea*; PaeG, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; RpaG, *Rhodopseudomonas palustris*; RsoG, *Ralstonia solanacearum*; RspG, *Rhodobactersphaeroides*; SonG1, *Shewanella oneidensis*; SonG2, *Shewanella oneidensis*; StyG, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi; VchG, *Vibrio cholerae*. Les traits vert, bleu et violet repèrent respectivement les zones A, B et C. Le trait noir délimite le domaine C-terminal. Les points rouges indiquent les résidus soumis à la mutagenèse dirigée. Les points noirs indiquent la position des mutations obtenues dans le clone A27 lors de la mutagenèse localisée par PCR dégénérée.

Eco6# 351.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....
EcoG VEIPTNDETN DN IVA YMTPE D Q LPEPGKEMNF KYTI TFSRDEDKLHAPDNAMVQ PRRSTGDKVKS NLI RQPDGT IAFVDF TGAEMKKLPEDT PVT AQT S IGDNGEIVES
StyG VEIPTNDETN DN IVA YMTPE D Q LPEPGKEMNF KYTI TFSRDEDKLHAPDNAMV LQ PRRSTGDKVKS NLI RQPDGT IAFVDF VGSADMKKLPPT PVA AQT S IGDNGEIVDS
KpNG VEIPTNDETN DN IVT YMTPE D Q LPEPGKEMNF KYTI TFSRDEDKAHAPDNAY VMQ PRRSTGDKVKS NLI RQPDGT IAFI VDF TGAEMKKLPADT PVA AQA S TGDNAEIVEN
NeuG VEIPTNDETN DN IVA FMTPE D Q LPEAGKBI NF KYTI TFSRDEDKLHAPDNAY VMQ TLRSTGDKVKS NLI RQPDGT IAFI I DFT GRKMKKLP QDT PVA AQA S IDDNGTIVES
EchG VEIPTADETN DN IVA FMTPE D LPEKGR LEV KYR LHT DEEALHS P QAY VMQ TLRSTGDKVKS NLI RQPDGT IAFVDF VSGKLDIDPNT P IASQA S IGDNGEIVEN
PaeG VEIPTPDETN DN IVA FMTPE D TQPEVGR PLDFAYRLHWTMDELEHDEKSSWVKQ TMRSTGDKVKS NLI RQQDGTAL VVDFEGPALKD LAPDA PVT TQVS TDSNAEIVEN
AviG1 VEIPTPDETN DN IVA FMS P A G Q P E P G Q P L D L N Y R L H W T R D E P G L H D R D S A M V E Q T L R A A G D V K Q N L V R Q P D G S T A L V V D F E G P A L K G L P P D A F L R P Q L G V D G N V E V K E N
RsoG VQIPTPDETN DN VVA YMTPE T PPKPQQPFNLE YR L L W Q K E G D -- K A P G L S W V T Q P R S H G W T T R P D E R K P D D T I A L V V D F E G P A L K L P P N A P V E P V F T A D A N G K I E S I
RpaG VEIPTREVEH DN IAS FDEKQPLRAKGBHI YTR L L H W G P D T P K P G L A - R F V R T G Y S A R G D N D -- R L F V L D L A G D R L K -- T V D A A A A V R G V V T A D K K G E I R N I
Song2 VEI P S N A E T N D N I V A Y M T P E Q G G L K Q A E P Y R Y S I R I T A S N D S P -- S F T N K A R V I R S S G Q K Q A G -- K E L L I D Y S -- N I K -- P Q D I E K I T I D A S I S K K I I S S
VchG TEIPTQSEIH DN IVA FMTPE Q P L A A G S E Y R F S Y H L I M W G - A Q P E A N Q A - I T V S R T A S G R A D I A K -- P T P X R L F V I D Y Q G G A K -- P A Q M P E P K -- V R S N A G V I S N V
song1 TEIPTSEIH DN IVS F M K P R Q P I P A G S E Y H F A Y R M S W G - D E P V A K N S - V V S R T A S G R A D I A K -- A T P R R L F V V D Y H L N G T M -- P D E L P L A K -- V R S S G G V I S N V
RspG VEIPTRYETN DN IVA F M V P E G Q I S A G D A R E F A Y R L R W G - A L P I E E P S D I A H I W E T P A G H G V S G -- V E N T G E T R K R F V I D F K G G L G G L P G D A E V E A I T S V Q - H G Q I V T Q

Domaine C-terminal

Eco6# 461.....470.....480.....490.....500.....510.....
EcoG TVRYNPVTKGWR L M R V K V K D A K K T T E M R A A L V N - A D Q T L S E T M S Y Q L P A N E --
StyG NVRYPVTKGWR L M L R V K V K D A K K T T E M R A A L V N - A D Q T L S E T M S Y Q L P A N E --
KpNG TVRYNPVTKGWR M I L R L K V K D P K K T T E M R A A L V N - G D D T L S E T M S Y Q L P A N E --
NeuG SVRYNPIIKGWR L T L R V K V K D V E K I T E M R A A L V N - S D Q I L S E T M S Y Q L P A D E --
EchG SVRYNPVTHGWR L T L R M K V K D N K Q P T E M R A A L V N - G E T T L T E T M S Y Q L P A N E --
PaeG SIRYNPVLKGWR L T L R I K V K D P K K P V E M R A A L V D E A Q P L S E T M S Y Q L P A D E --
AviG1 SIRYNPATKGWR L M L R V S V K D P K K P T E M R V A L V N - G E K T L E T M S Y Q L P A N E --
RsoG FGQPNATGWR V T V R L K R V D D K P I D L R G Y L R S - G G T G L S E T M S Y L L P P G --
RpaG VTQPNPAMGWR L S F D L A Q A R -- A P V E L R A V C E - G D A A V S E V M L E R W T P --
Song2 R I V A H P E I N G A R I F I T F E P E S T - N V A E R I Q L R K - D E K P V A A T M L Y R W N S D D W P
VchG VLRDNPANNR Y R L S F E F D P G E V - T L A E R A E L L T L - Q E A R P V E T M L E R W T L --
Song1 V I A R N A A N N G Y R L A F E L E P E D K - D L I E R A E L K F - S T P R Q V E T M L E R W T L --
RspG T I E R L D G M D I W R L V L D V A A A A G - A T V E L A A H I A G - Y G R K L S E T M L Y Q M M K A --

Avec l'aide de Carmen Ödberg-Ferragut, nous avons ainsi isolé trois mutants : le clone A27 de la zone A et les clones C20 et C66 de la zone C. Des expériences répétées ont montré que seuls ces trois clones incorporait de manière très reproductible 60 % du phosphoglycérol tritié en 2 par rapport au témoin positif NF1528 (pNF595 / NF702). Les plasmides portant la ou les mutations putatives extraits de ces trois clones ont ainsi été transformés dans la souche NF724. Ces clones présentent un marquage au D-U-[¹⁴C] glucose identique au témoin positif NF1527 (NF724 / pNF595).

Les OPG synthétisés par ces mutants, préalablement purifiés par une chromatographie de filtration sur gel G25 (cf. matériels et méthodes), ont fait l'objet d'une analyse structurale plus approfondie et ont été comparés avec les OPG synthétisés par le témoin positif, la souche NF1516 (pNF595 / NF702).

2.1.1.2. Analyse structurale des OPG des clones A27, C20 et C66

2.1.1.2.1. Détermination de la structure du squelette glucosidique

Le degré de polymérisation a été déterminé grâce à une analyse en spectrométrie de masse MALDI en mode positif sur une matrice de 2,5-dihydroxybenzoïque des OPG entièrement désubstitués. Les spectres obtenus pour ces trois clones ne montrent aucune différence avec un spectre obtenu dans le cas du témoin positif. Ces mutants synthétisent des OPG ayant le même degré de polymérisation. Le type de liaison glucosidique et la détermination du nombre de points de branchement ont été obtenus par une étude en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse. Là encore aucune différence n'a pu être observée avec le témoin positif.

Ces trois mutants synthétisent des OPG dont le squelette est strictement identique à celui des OPG synthétisés par le témoin positif.

2.1.1.2.2. Analyse structurale de la substitution des OPG

La 3-aminoquinoline a été utilisée comme matrice en mode négatif pour l'analyse des OPG non désubstitués. La figure II-II-9 montre les spectres obtenus dans le cas du témoin positif et du mutant A27. Le rapport m/z attribué à chaque pic est détaillé dans le tableau II-II-1. La comparaison des deux spectres nous permet d'observer d'une part que certains pics sont à la fois présents chez le témoin positif et le mutant. Ces pics de masse $[M-H]^-$ = 1405, 1567, 1729, 1891, 2053 correspondent respectivement à des OPG constitués de 7, 8, 9, 10, 11 résidus de glucose, chacun de ces OPG comportant un résidu de phosphoglycérol et un résidu de succinate. Cependant certains pics dans le spectre provenant du clone A27 sont quasi absents par rapport au témoin positif. Ces pics de masse $[M-H]^-$ = 1305, 1467, 1629, 1791, 1953 correspondent respectivement aux OPG constitués de 7, 8, 9, 10, 11 résidus de glucose, chacun de ces OPG comportant un résidu de phosphoglycérol (Tableau II-II-1). Dans le cas de ce mutant, la substitution des OPG par le phosphoglycérol se fait préférentiellement sur des OPG déjà substitués par des résidus de succinate.

Les spectres obtenus pour les OPG non désubstitués des clones C66 et C20 ne sont pas reproductibles, nous n'avons pas pu poursuivre l'interprétation.

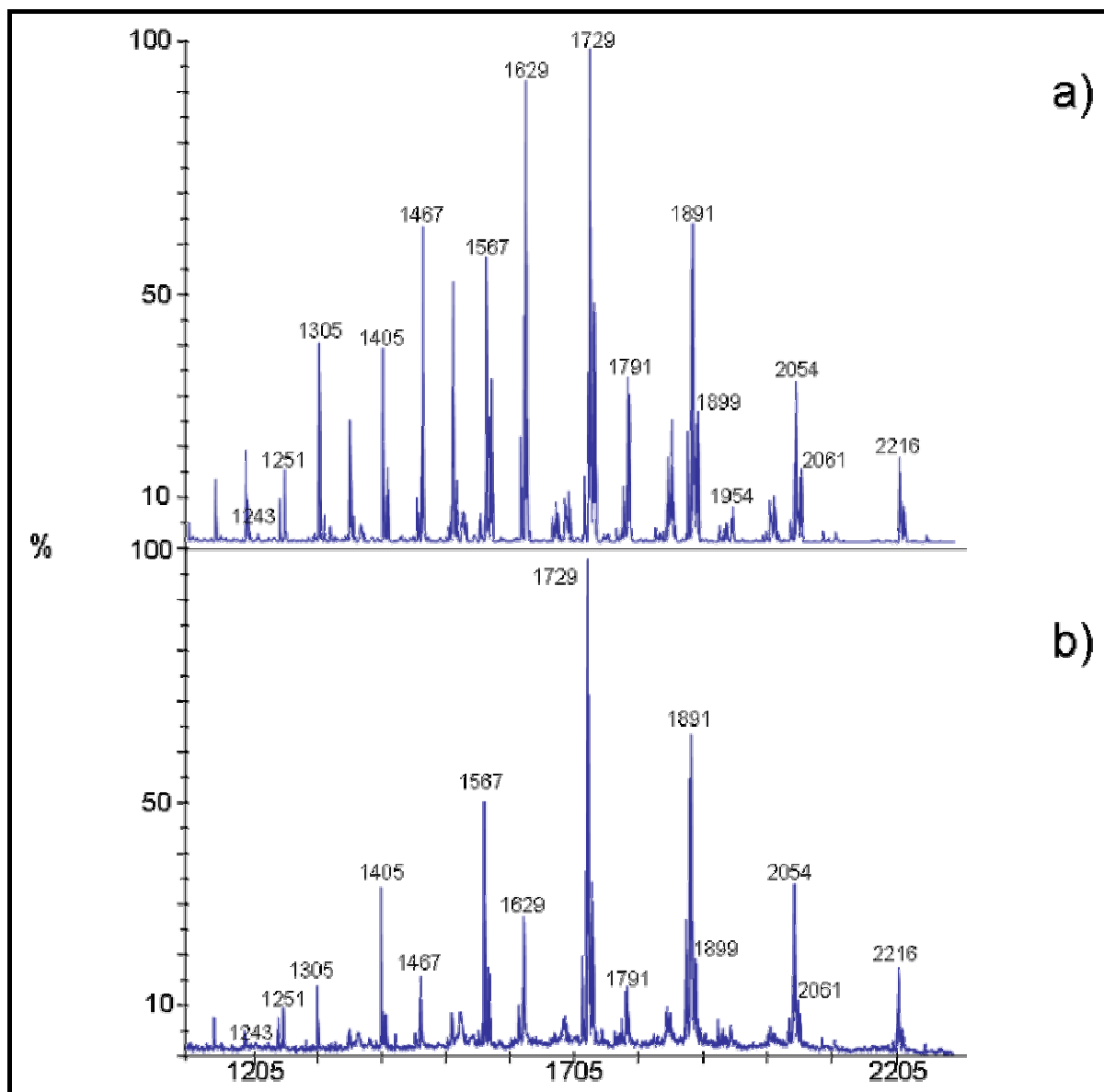


Figure II-II-9 : Spectre de masse MALDI obtenu en mode négatif des OPG natifs synthétisés par le témoin positif (a) et le mutant A27 (b).

| [M-H] ⁻ | Composition | | |
|--------------------|-------------|-----------------|-----------|
| | Glucose | Phosphoglycérol | succinate |
| 1191 | ND | | |
| 1243 | 6 | 1 | 1 |
| 1251 | 7 | - | 1 |
| 1305 | 7 | 1 | - |
| 1353 | ND | | |
| 1405 | 7 | 1 | 1 |
| 1467 | 8 | 1 | - |
| 1515 | ND | | |
| 1567 | 8 | 1 | 1 |
| 1629 | 9 | 1 | - |
| 1721 | 8 | 2 | 1 |
| 1729 | 9 | 1 | 1 |
| 1737 | 10 | - | 1 |
| 1791 | 10 | 1 | - |
| 1891 | 10 | 1 | 1 |
| 1899 | 11 | - | 1 |
| 1953 | 11 | 1 | - |
| 2053 | 11 | 1 | 1 |
| 2061 | 12 | - | 1 |
| 2216 | 12 | 1 | 1 |

**Tableau II-II-1 : Attribution des pics obtenus lors de l'analyse des OPG synthétisés par le témoin positif et le mutant A27 en MALDI-MS en mode négatif.
ND (non déterminé) ; - (non présent)**

2.1.1.3. Détermination et localisation de la ou les mutations portées par le clone A27

Le séquençage de la région amplifiée par PCR dégénérée entre les sites *Xho*I et *Mfe*I (figure 2A et 2B) a révélé que ce fragment porte deux mutations. Ce sont les résidus Asn 96 vers Asp et Lys 107 vers Glu (Figure II-II-8). La mutation N96D entraîne le passage d'un résidu polaire non chargé à un résidu acide ; la mutation K107E entraîne un changement d'un résidu basique en résidu acide.

Sur les 13 séquences OpgG alignées, l'acide aminé N96 constitue un résidu conservé 8 fois et l'acide aminé K107 est un résidu conservé 6 fois. Apparemment ces acides aminés mutés ne sont pas situés dans une région fortement conservée, toutefois, ils sont tous deux conservés chez des protéobactéries dont la structure des OPG est constituée d'un squelette linéaire de résidus de glucose liés en β ,1-2 présentant des branchements en β ,1-6.

L'obtention de la structure tridimensionnelle d'OpgG a permis de localiser les deux mutations qui sont toutes les deux situées sur la face externe de la protéine (Figure II-II-10).

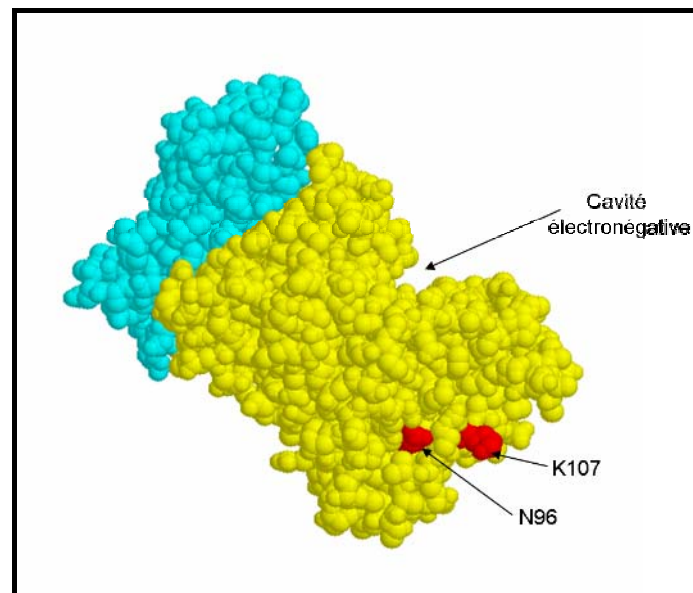


Figure II-II-10 : Structure tridimensionnelle d'OpgG (1TXK). En jaune, le domaine N terminal et en cyan, le domaine C terminal. La localisation des résidus N96 et K107 est représentée en rouge.

Cette stratégie de mutagenèse localisée est une méthode lourde notamment au niveau du criblage des clones. Nous avons choisi d'opter pour la mutagenèse dirigée d'autant plus que nous avons acquis la structure tridimensionnelle d'OpgG.

2.1.2. Analyse structurale et mutagenèse dirigée du domaine N terminal d'OpgG

2.1.2.1. Analyse structurale

Le domaine N-terminal de la protéine OpgG regroupe les trois quarts de la protéine (résidus 22-388). Il s'agit d'un domaine de type sandwich β composé de 25 brins β organisés en 4 feuillets β (A, B, C et D), entourés de 2 hélices α et de 6 hélices 3_{10} (Figure II-II-14). La plus part de ces brins β sont disposés de manière antiparallèle (Figure II-II-12). Ce domaine présente une large cavité forme de Y qui mesure environ 35 Å de longueur, entre 9 et 15 Å de largeur et environ 15 Å de hauteur. Cette crevasse constitue la zone la plus électronégative de la surface de la protéine. On y retrouve de nombreux résidus acides (E81, D90, D146, E147, G183, G184, D273, D324, D326, D327, G349, D357, G358, D361 et D370), deux résidus basiques (R158 et R171). On y retrouve également de nombreux acides aminés aromatiques et leur chaîne latérale sont toutes dirigées vers l'intérieur de la cavité : Y56, Y59, Y83, Y88, F89, Y156, Y166 et F185 (Figure II-II-11).

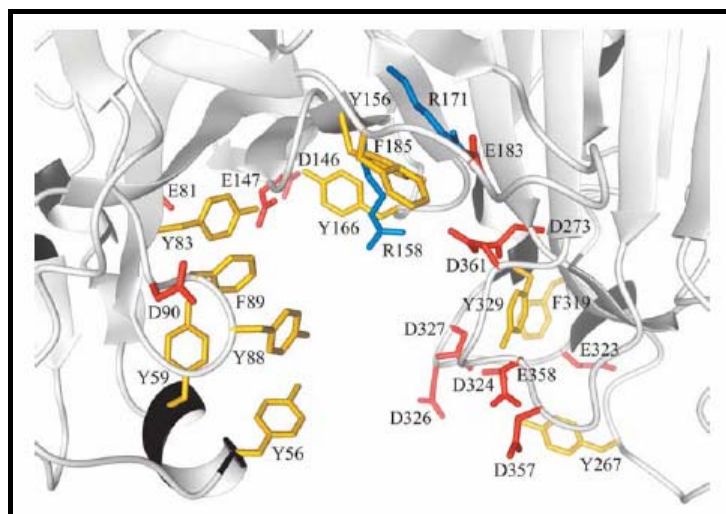


Figure II-II-11 : Cavité du domaine Nter d'OpgG d'*Escherichia coli*. En jaune, les résidus hydrophobes ; en bleu, les résidus basiques et en rouge, les résidus acides (Hanouille et al. 2004).

L'utilisation du serveur DALI (Distance ALignement matrices) (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) qui compare la structure tridimensionnelle de la protéine avec les données de la Protein Data Bank a permis de trouver des analogues structuraux à ce domaine. Le domaine 5 de la β galactosidase chez *E. coli* (PDB : 1BGL), le domaine N-ter de la glucodextranase chez *Arthro bacter globiformis* (PDB : 1UG9), le domaine C-ter de la 4- α -glucanotransférase chez *Thermococcus litoralis* (PDB : 1K1W) ou encore le domaine central de la hyaluronate-lyase chez *Streptococcus pneumoniae* (PDB : 1EGU). Toutes ces enzymes interviennent dans le métabolisme des sucres mais ces domaines analogues au domaine N-terminal d'OpgG ne portent pas l'activité catalytique.

Par contre, le squelette peptidique de la galactose mutarotase chez *Lactococcus lactis* (PDB : 1MMU) est superposable au domaine N-terminal d'OpgG (Figure II-II-12). Ce domaine présente une cavité électro négative constituée des acides aminés responsables de l'activité catalytique de cette enzyme : on y retrouve des résidus acides et basiques responsables des interactions hydrophiles et des résidus aromatiques réalisant des interactions hydrophobes avec le cycle pyranique du galactose permettant le maintien du substrat dans le site catalytique (Thoden et al. 2002). Ces observations semblent désigner un rôle fonctionnel important pour la cavité de la protéine OpgG.

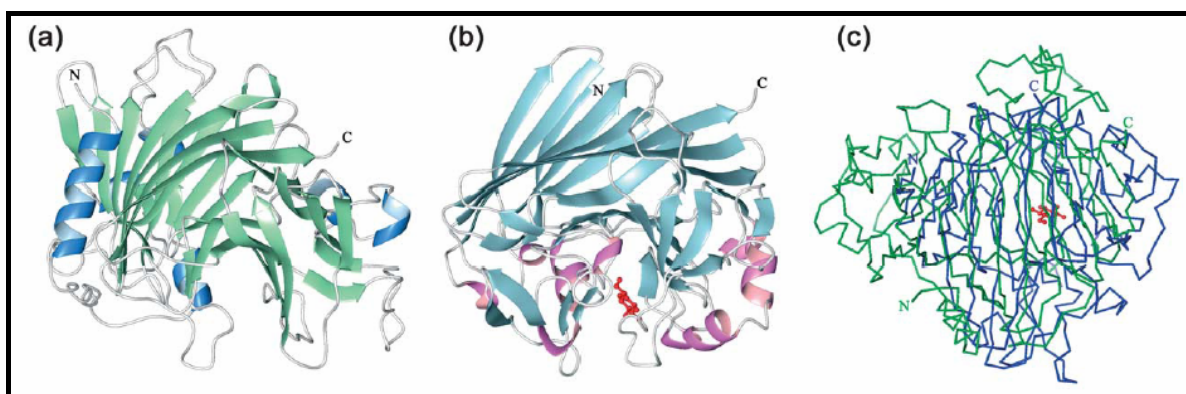


Figure II-II-12 : (a) : structure tridimensionnelle du domaine N ter d'OpgG d'*Escherichia coli* ; (b) : structure tridimensionnelle de la galactomutarotase de *Lactococcus lactis* (1MMU), (c) : superposition des squelettes peptidiques, en vert le domaine N terminal d'OpgG, en bleu le domaine de la galactomutarotase (Hanouille et al. 2004).

2.1.2.2. Mutagenèse dirigée du domaine N terminal d'OpgG

La plus part des résidus constituant cette cavité électro négative sont conservés chez les protéines OpgG des protéobactéries. Pour voir un éventuel rôle de cette cavité, de la mutagenèse dirigée par PCR a été réalisée sur les résidus conservés chez toutes les protéines OpgG. Les mutations ont été réalisées dans le plasmide pNF595, *opgG* dans pUC19. Chaque plasmide portant une mutation a été utilisé pour transformer la souche NF702 qui possède une mutation non polaire d'*opgG* par insertion d'une cassette *neo* (cf matériels et méthodes).

Les résidus ont été échangés en résidus de même type afin de limiter la perte de fonction : D146E (pNF1109), E147D (pNF1099), Y156F (pNF1100), R158K (pNF1101), E183D (pNF1096), E184D (pNF1097) sauf pour D361V (pNF1098) pour des facilités de clonage (Figure II-II-13).

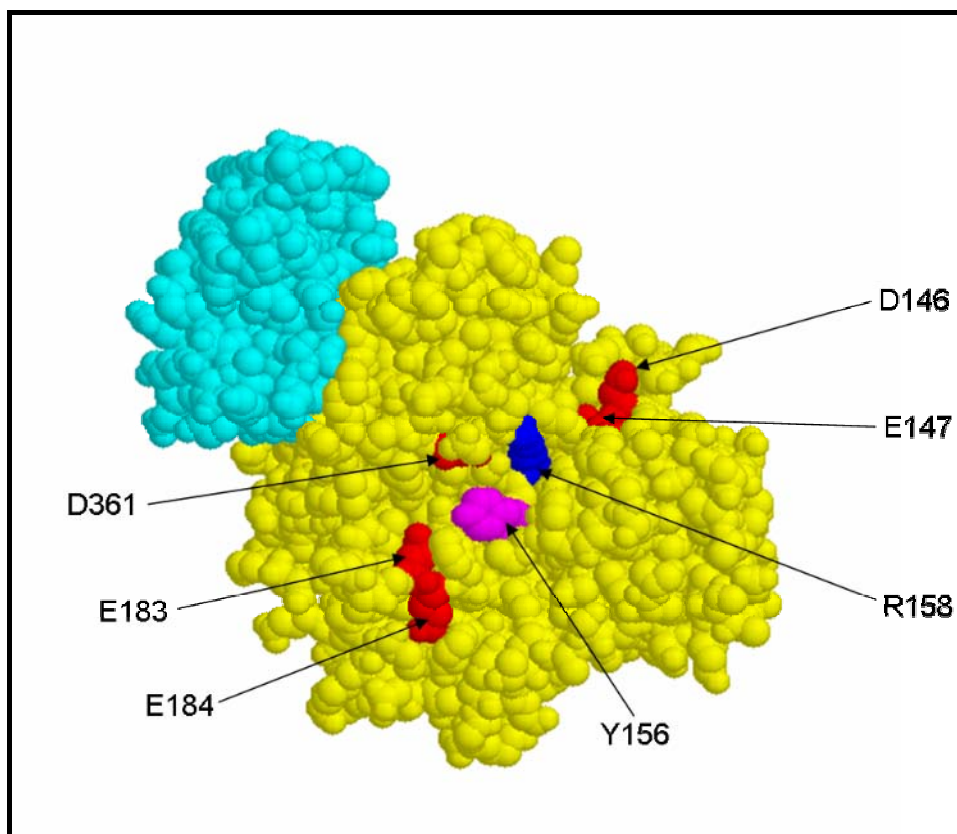


Figure II-II-13 : Localisation des résidus mutés lors de la mutagenèse dirigée. En rouge, les résidus acides, en bleu, les résidus basiques et en magenta, les résidus aromatiques.

Les OPG synthétisés par une souche sauvage sont branchés et possèdent sur le carbone C6 des branches des substitutions tels que le sn-1-phosphoglycérol. Ainsi, un marquage au 2-[³H] glycérol a permis de marquer spécifiquement mais et de façon semi quantitative les OPG synthétisés par chacun de ces clones. Il apparaît clairement, que quelque soit le résidu muté, la synthèse d'OPG est perturbée. Pour chacun de ces mutants, les OPG, extraits au charbon, ont été purifiés par chromatographie sur colonne Sephadex G25 (Figure II-II-15). Dans le cas du témoin positif (pNF595/NF702) les OPG sont élués en un seul pic entre les fractions 32 et 46 avec un maximum à la fraction 37. Dans le cas du témoin négatif (NF702), le pic correspondant aux OPG est absent. On peut noter la présence d'un autre pic compris entre les fractions 50 et 67 correspondant à des molécules de plus petits poids moléculaires dont la nature n'est pas connue. Pour chacun des mutants, un dosage à l'anthrone a été réalisé sur chaque fraction afin de déterminer la quantité d'équivalent glucose des OPG synthétisés.

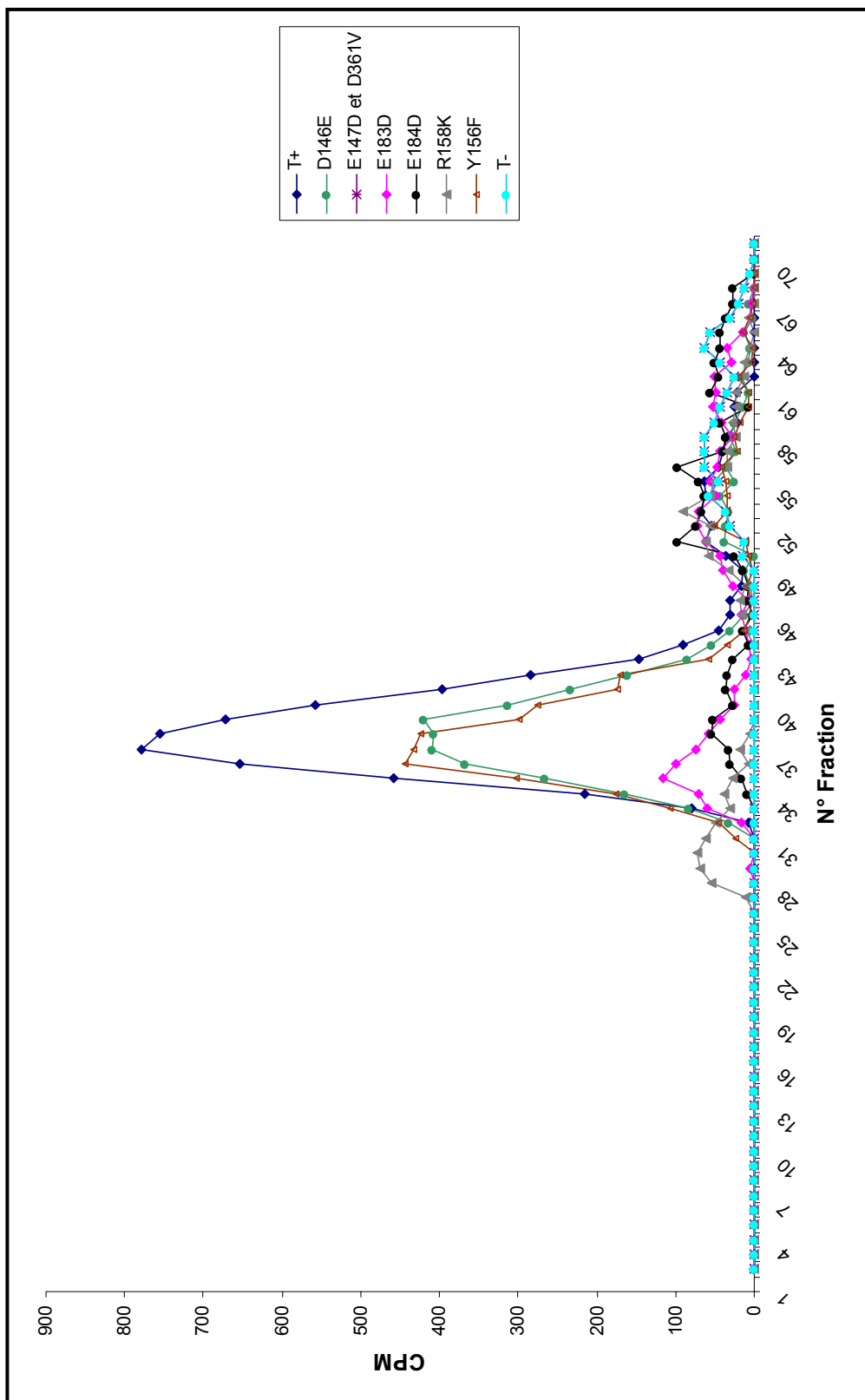


Figure II-II-15 : Chromatographie sur gel Sephadex G 25 des OPG marqués au 2- ^3H glycérol. En abscisse, chaque fraction correspond à 1,5 mL collectés à 15 mL/h. En ordonnée est indiqué le nombre de CPM à partir de 200 μL d'échantillon.

| Mutation | % Gro | % Glc |
|-----------------|--------------|--------------|
| T+ | 100 | 100 |
| D146E | 70 | 70 |
| E147D | 0 | 0 |
| D361V | 0 | 0 |
| E183D | 9 | 6 |
| E184D | 6 | 76 |
| R158K | 6 | 21 |
| Y156F | 70 | 70 |

Tableau II-II-2 : Proportion en glycérol et proportion en équivalent glucose par rapport au témoin positif des OPG synthétisés par chacun des mutants.

2.1.2.1.1. Analyse du mutant D146E (pNF1109)

Ce mutant synthétise 70% d'OPG par rapport au témoin positif. Ces OPG sont normalement substitués puisque ce rapport est conservé lors du marquage des cellules au glycérol tritié (Tableau II-II-2). Les OPG totalement désués, sont analysés en spectrométrie de masse MALDI-MS en mode positif en utilisant une matrice de 2,5-dihydroxybenzoïque. Cette méthode permet la formation d'ions $[M+Na]^+$. Les spectres obtenus dans le cas du témoin positif et de ce mutant sont identiques. Leur analyse révèle principalement 10 espèces d'ions moléculaires de rapport m/z de 851, 1013, 1175, 1337, 1499, 1661, 1823, 1985, 2147 et 2309. Ces masses correspondent à celle des OPG linéaires dont le degré de polymérisation varie de 5 à 14 résidus de glucose avec un maximum de 9 résidus. On peut noter la présence de pics de plus faible intensité dont la valeur m/z se situe à 1159, 1321, 1483 et 1645, celles-ci représentent une différence d'incrément de masse de 16 avec respectivement les valeurs m/z de 1175, 1337, 1499 et 1661. Ceci peut-être expliqué par la présence d'ions $[M+Li]^+$ suite à la réaction de neutralisation par le LiOH (cf.matériels et méthodes) (Figure II-II-16). Il apparaît évident que cette mutation n'altère pas le degré de polymérisation des OPG. L'analyse des OPG, partiellement méthylés et acétylés, en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse révèle la présence de trois espèces correspondant au 3-4-di-O-méthyl glucose, 3-4-6-tri-O-méthyl glucose, et 2-3-4-6-tetra-O-méthyl glucose. On obtient ainsi pour ce mutant 31% de glucose liés en β -1,2, 22% de point de branchement et 37% de glucose aux extrémités non réductrices. Les OPG synthétisés par ce mutant ont une structure identique aux OPG du témoin positif (Tableau II-II-3).

2.1.2.1.2. Analyse des mutants E147D (pNF1099) et D361V (pNF1098)

Dans le cas des mutants E147D et D361V, nous pouvons noter l'absence de marquage au niveau des fractions correspondant aux OPG dans le cas du témoin positif. L'absence de synthèse d'OPG a été confirmée par dosage à l'antrone sulfurique. E147D et D361V sont deux mutants ponctuels incapable de synthétiser des OPG (Tableau II-II-2).

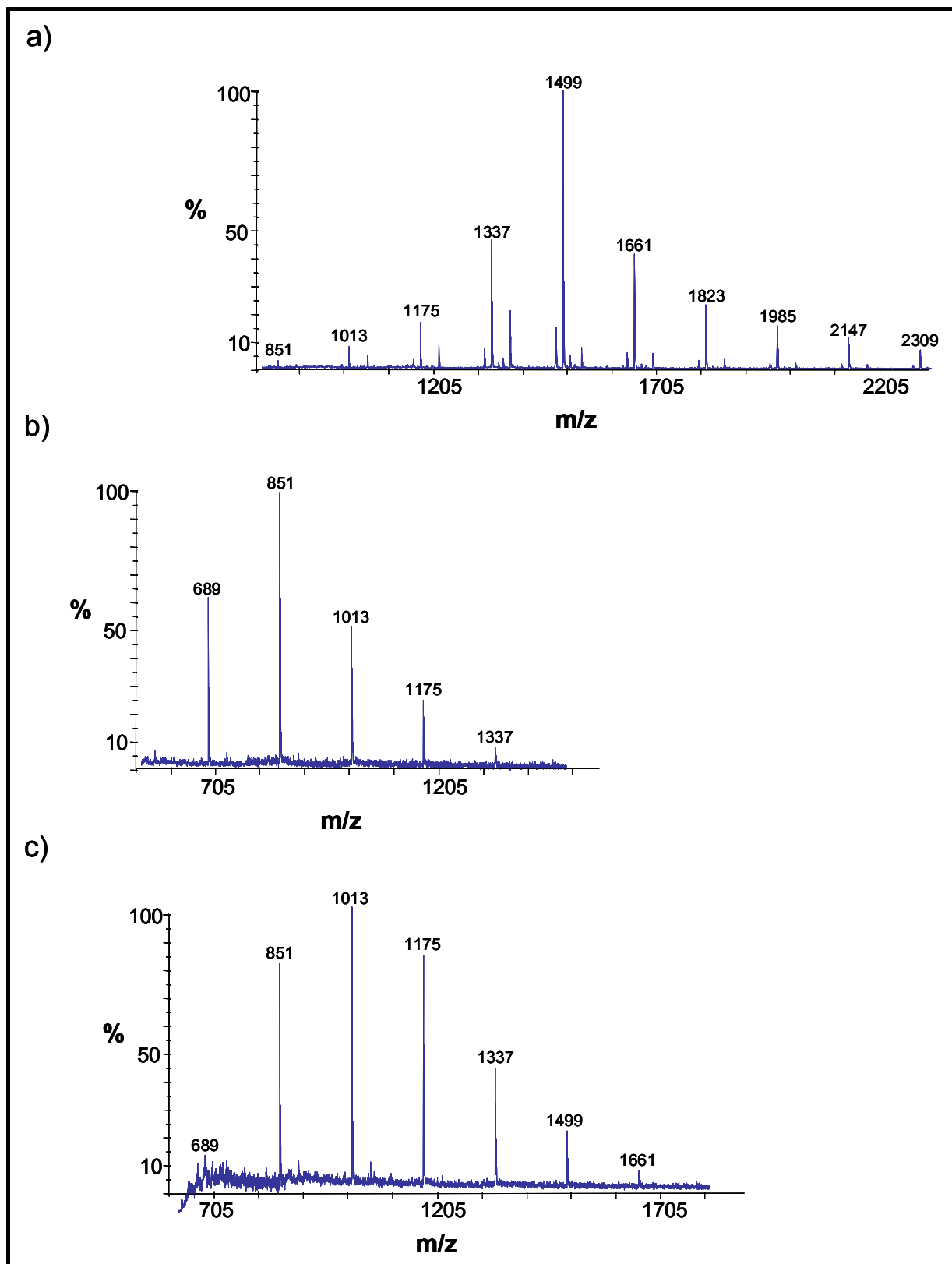


Figure II-II-16 : Spectres de masse MALDI obtenu en mode positif des OPG désubstitués du témoin positif et du mutant D146E (a), du mutant R158K (b), du mutant Y156F (c).

| | T+ | D146E | E184D | R158K | Y156F |
|---------------------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2-3-4-6-tetra-O-méthyl glucose | 34% | 37% | 42% | 9% | 16% |
| 3-4-6-tri-O-méthyl glucose | 32% | 31% | 28% | 75% | 70% |
| 3-4-di-O-méthyl glucose | 24% | 22% | 20% | 6% | 4% |

Tableau II-II-3 : Pourcentage des dérivés méthylés des OPG pour le témoin positif T+ et les mutants D146E, E184D, R158K, Y156F

2.1.2.1.3. Analyse du mutant E183D (pNF1096)

Ce mutant est affecté dans sa capacité de synthèse des OPG. Le marquage par le 2- ^3H glycérol et le dosage à l'antrone sulfurique montre que ce mutant n'est capable de synthétiser qu'une très faible quantité d'OPG : environ 6 à 9 % par rapport au témoin positif. Il apparaît que ces OPG ont certainement une structure équivalente aux OPG d'une souche sauvage puisque le rapport %Glycérol / %Glucose est proche de 1 (Tableau II-II-2). Néanmoins la trop faible quantité d'OPG obtenue pour ce mutant ne nous a pas permis de poursuivre l'analyse structurale.

2.1.2.1.4. Analyse du mutant E184D (pNF1097)

Ce mutant synthétise 75% d'OPG par rapport au témoin positif. Ces OPG sont faiblement marqués par le 2- ^3H glycérol, seulement 9% par rapport au témoin positif (Tableau II-II-2). L'analyse structurale de ces OPG a été poursuivie. Les OPG désubstitués ont été analysés en spectrométrie de masse MALDI en mode positif. Ce mutant synthétise des OPG linéaires de degré de polymérisation similaire au témoin positif. Les OPG varient de 5 à 14 résidus de glucose avec un maximum à 9 résidus. L'analyse, des dérivés partiellement méthylés et acétylés, en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse ne montre pas de différences avec le témoin positif (Tableau II-II-3).

2.1.2.1.5. Analyse du mutant R158K (pNF1101)

Ce mutant synthétise 20% d'OPG par rapport au témoin positif. Ces OPG sont faiblement marqués par le 2- ^3H Glycérol, seulement 9% par rapport au témoin positif (Tableau II-II-2). L'analyse en spectrométrie de masse MALDI en mode positif révèle 5 espèces d'ions moléculaires $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de rapport m/z de 689, 851, 1013, 1175, 1337. Ces masses correspondent à celle des OPG linéaires dont le degré de polymérisation varie de 4 à 8 résidus de glucose avec un maximum de 5 (Figure II-II-16). L'analyse en GC-MS montre une grande différence avec le témoin positif. Dans le cas du mutant, on obtient 75% de glucose liés en β -1,2, 6% de point de branchement et 9% de glucose aux extrémités non réductrices. Dans le cas d'un témoin positif, on obtient 32% de glucose liés en β -1,2, 24% de point de

branchement et 32% de glucose aux extrémités non réductrices. Il y a donc moins d'un point de branchement par molécule d'OPG chez ce mutant (Tableau II-II-3).

2.1.2.1.6. Analyse du mutant Y156F (pNF1100)

Ce mutant synthétise 70% d'OPG par rapport au témoin positif. Ces OPG sont normalement substitués puisque ce rapport est conservé lors du marquage des cellules au glycérol tritié. L'analyse de ces OPG en spectrométrie de masse MALDI montre que ces molécules sont en moyenne plus courtes car le DP varie de 4 à 10 résidus de glucose avec une prépondérance des espèces constitués de 5 à 7 résidus (Figure II-II-16). L'analyse en GC-MS montre également une grande différence avec le témoin positif. On obtient 70% de glucose liés en β -1,2, 4% de point de branchement et 16% de glucose aux extrémités non réductrices. Il y a donc moins d'un point de branchement par molécule d'OPG (Tableau II-II-3).

L'impact de ces différents résidus dans la cavité électro-négative est représenté dans la figure II-II-17.

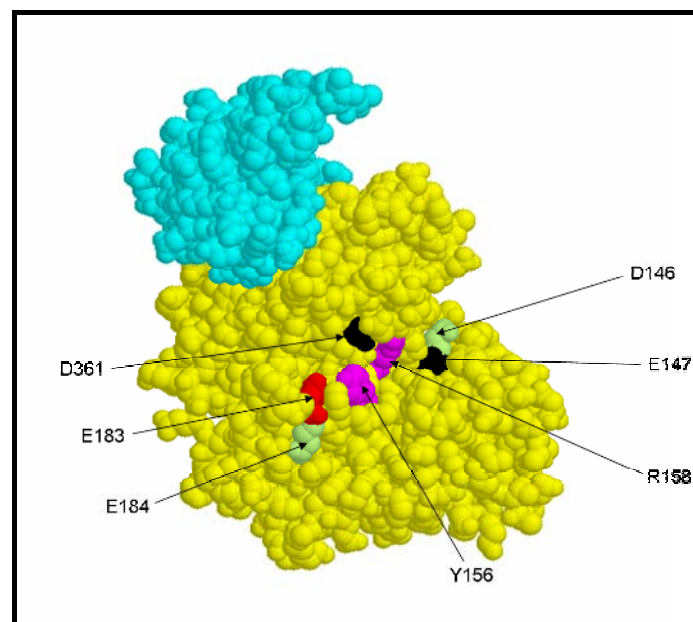


Figure II-II-17 : Impact des différents résidus de la cavité électro-négative sur la synthèse des OPG : en vert, les résidus dont la mutation n'engendre pas de modifications de la structure des OPG ; en magenta, les résidus dont la mutation engendre une modification de la structure des OPG ; en rouge les résidus dont la mutation entraîne une synthèse d'OPG très diminuée ; en noir, les résidus dont la mutation entraîne une perte totale de la synthèse des OPG.

2.2. Fonction du domaine C-terminal d'OpgG

2.2.1. Analyse structurale du domaine C-terminal d'OpgG

Le domaine C-terminal d'OpgG est composé de 111 acides aminés (résidus 401 à 512) organisés en 2 feuillets β (E et F) séparés par 1 hélice 3_{10} . Ces feuillets β E et F sont respectivement constitués de 4 et 3 brins β antiparallèles formant ainsi un sandwich de type β à 7 brins. L'utilisation du serveur DALI a permis de trouver des analogues structuraux au domaine C terminal d'OpgG qui ont tous un repliement de type immunoglobuline. Ce genre de repliement est très souvent retrouvé dans les interactions. Il peut s'agir d'interaction de type protéine-protéine comme pour le domaine 3 de la région extracellulaire de l'invasine chez *Yersinia pseudotuberculosis* (PDB : 1CWV) ou d'interaction de type protéine-sucre comme pour le domaine 2 d'une sialidase chez *Micromonospora virifidifaciens* (PDB : 1EUT), le domaine 4 de la β -galactosidase chez *E. coli* (PDB : 1BGL), le domaine B d'une glucodextranase chez *A. globiformis* (PDB : 1UG9), le domaine CBM9 d'une xylanase chez *Thermotoga Maritima* (PDB : 118A) et le domaine N-terminal de l'enzyme de branchement du glycogène chez *E. coli* (PDB : 1M7X) (Hanouille et al. 2004) (Figure II-II-18).

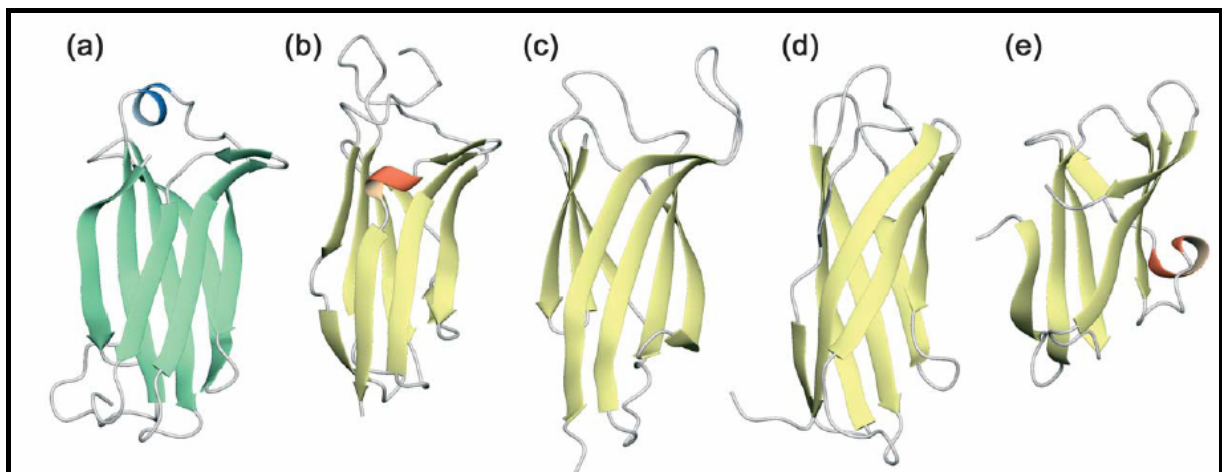


Figure II-II-18 : structure tridimensionnelle du domaine C ter d'OpgG d'*Escherichia coli* (a), de domaine 3 de la région extracellulaire de l'invasine chez *Yersinia pseudotuberculosis* (1CWV) (b), du domaine 4 de la β -galactosidase chez *E. coli* (1BGL) (c), du domaine 2 d'une sialidase chez *Micromonospora virifidifaciens* (1EUT) (d) et du domaine N terminal de l'enzyme de branchement du glycogène chez *E. coli* (1M7X) (e). Les brins β sont représentés soit en vert soit en jaune, les hélices α sont représentées soit en bleu soit en rouge (Hanouille et al. 2004).

2.2.2. Délétion du domaine C-terminal d'OpgG

Le domaine C-terminal est très faiblement conservé chez les protéines OpgG des protéobactéries (Figure II-II-8). Pour en étudier la fonction, nous avons choisi de réaliser une délétion de ce domaine. Nous avons à disposition une construction réalisée par Laurent Debarbieux au cours de sa thèse (Debarbieux, 1995). Le plasmide pNF244 (cf. matériels et méthodes) a été linéarisé par l'enzyme de restriction *MluI* au début de la partie codant le domaine C-terminal de la protéine OpgG. Le mutant *MluI* (pNF424/NF702) exprime, en mult copie, une protéine OpgG stable tronquée de 89 acides aminés initiaux et modifiée par 16 nouveaux acides aminés :

⁴⁰⁷-ASFNGGCEAVEPDSPA-⁴²².

L'analyse des OPG, marqués au 2-³H] glycérol purifiés par chromatographie de filtration sur gel G25 montre que ce mutant synthétise 25% d'OPG par rapport à un témoin positif. La substitution par le *sn*-1-phosphoglycérol ne semble pas être perturbée puisque le rapport %Glycérol / %Glucose est proche de 1

Les OPG, non marqués, totalement désubstitués ont été analysés en spectrométrie de masse MALDI en mode positif en utilisant une matrice de 2,5-dihydroxybenzoïque afin de déterminer le degré de polymérisation. Cette méthode révèle principalement 13 espèces d'ions moléculaires [M+Na]⁺ de rapport m/z de 1337, 1499, 1661, 1823, 1985, 2147, 2309, 2471, 2633, 2795, 2957, 3119, 3281. Ces masses correspondent à celle des OPG linéaires dont le degré de polymérisation varie de 8 à 20 résidus de glucose avec un maximum de 10 résidus. Ce mutant synthétise des OPGs de degré de polymérisation plus grand (Figure II-II-19).

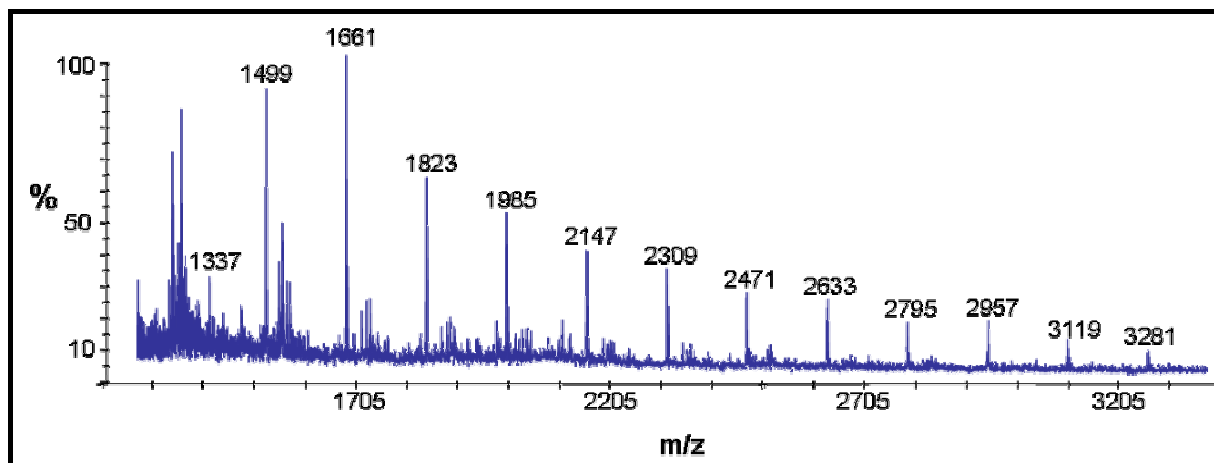


Figure II-II-19 : Spectre de masse MALDI obtenu en mode positif des OPG désubstitués synthétisés par le mutant M1ul.

L'analyse des OPG, partiellement méthylés et acétylés, en chromatographie en phase gazeuse couplée à une analyse en spectrométrie de masse, révèle la présence de trois espèces correspondant au 3-4-di-O-méthyl glucose, 3-4-6-tri-O-méthyl glucose, et 2-3-4-6-tetra-O-méthyl glucose. Nous avons pu intégrer chaque pic. Dans le cas du mutant, on obtient 52% de glucoses liés en β -1,2, 15% de point de branchement et 23% de glucose aux extrémités non réductrices. Dans le cas d'un témoin positif, on obtient 33% de glucose liés en β -1,2, 25% de point de branchement et 33% de glucose aux extrémités non réductrices. Ce mutant synthétise des OPG relativement moins branchés.

3. Discussion

3.1. OpgG une nouvelle enzyme de branchement ?

Le travail effectué au cours de cette thèse a été focalisé sur la construction de mutants ponctuels non nuls d'OpgG afin d'appréhender la fonction de cette protéine dans le mécanisme de synthèse des OPG. Le rôle attribué à cette protéine est basé sur des observations complémentaires provenant d'expériences *in vitro* et *in vivo*. D'une part, les travaux de Weissborn et Kennedy (1984) montrent que le système glucosyltransférase nécessite *in vitro* deux partenaires : une fraction soluble identifiée comme étant l'ACP (Therisod et al. 1986) et une fraction membranaire dont l'activité glucosyltransférase est reliée au locus *mdoA* (Bohin et Kennedy, 1984). Dans ce système *in vitro*, les glucanes synthétisés sont composés d'une chaîne linéaire de résidus de glucose reliés par des liaisons $\beta,1-2$. Plus tard, Lacroix et al. (1989) isolent le locus *mdoA* et définissent l'existence de deux gènes organisés en opéron (1991) : *opgG* code une protéine périplasmique et *opgH* code la glucosyltransférase dont l'activité avait été détectée dans la fraction membranaire. Puisque l'interruption de l'un ou l'autre gène entraîne une absence de synthèse des OPG et compte tenu de la structure des OPG observés *in vitro* (chaîne linéaire $\beta,1-2$) et chez une souche sauvage (chaîne linéaire $\beta,1-2$ et branchées $\beta,1-6$), il a été proposé (Lacroix et al, 1991) que OpgG interviendrait dans la translocation des OPG à travers la membrane et dans l'activité de branchement.

OpgG est une protéine indispensable à la synthèse des OPG. Une insertion de transposon dans le gène *opgG* inhibe la synthèse d'OPG chez *E. coli* et chez d'autres protéobactéries comme *E. chrysanthemi*, *P. syringae*... Les protéines OpgG des protéobactéries sont très conservées entre elles mais ne ressemblent à aucune autre. L'obtention de la structure tridimensionnelle par cristallographie puis diffraction des rayons X (Hanouille et al. 2004) nous a permis de vérifier qu'OpgG n'appartenait à aucune famille de protéines connues. La recherche d'analogues structuraux dans le serveur DALI montre tout de même quelques homologies avec des enzymes intervenant dans le métabolisme des sucres.

La protéine OpgG (1TXK) présente deux domaines structuraux de type sandwich β bien distincts qui ont pu être analysés séparément. Le domaine N-terminal possède des homologies structurales avec des domaines de protéines impliquées dans la liaison ou le métabolisme de composés glycosidiques. De manière intéressante, le squelette peptidique d'OpgG est superposable à celui de la galactomutarotase de *L. lactis*. Cette enzyme catalyse la conversion du β -D-galactose en α -D-galactose, première étape dans la conversion du β -D-galactose en glucose-1-phosphate. Cette enzyme possède un unique domaine qui porte l'activité catalytique. Ce domaine est caractérisé par une cavité fortement électronégative similaire à celle d'OpgG dans laquelle on retrouve des acides aminés intervenant dans la reconnaissance et l'interaction avec le substrat et les acides aminés directement impliqués dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. Ces observations confortent l'idée que cette cavité électronégative du domaine N-terminal d'OpgG porterait l'activité catalytique de la protéine. Ainsi de la mutagenèse dirigée a été réalisée sur les résidus de cette cavité conservés chez toutes les OpgG des protéobactéries.

Les mutant R158K et Y156F sont les premiers mutants ponctuels d'OpgG capables de synthétiser des OPG de structures modifiées. Ces mutants synthétisent des OPG linéaires et très peu branchés. R158K et Y156F sont de bons candidats pour appuyer l'hypothèse d'un rôle d'OpgG dans la formation des branches.

Les mutant E147D et D361V sont les seuls mutants ponctuels d'OpgG incapable de synthétiser des OPG. Les résidus E147 et D361 sont indispensables à l'activité de la protéine OpgG. Il s'agit des premiers mutants ponctuels du gène *opgG* montrant un tel phénotype. Le changement en un résidu de même charge (E147D) provoque un effet dramatique sur la synthèse d'OPG. La localisation de la fonction acide COO^- à la surface de cette cavité électronégative semble très importante et renforce l'idée qu'OpgG est bien une enzyme.

Ces 4 résidus sont fortement exposés dans la cavité et jouent un rôle important dans l'activité de la protéine OpgG. OpgG ferait partie des glycosyl-hydrolases (GH) et aurait pour rôle de cliver un résidu à une extrémité de la chaîne linéaire de glucose en cours de synthèse et de rebrancher en β -1,6 par un mécanisme de rétention de l'anomérie. Dans le cas de la galactomutarotase et comme dans la plupart des glycosyl-hydrolases, trois acides aminés sont importants dans l'activité catalytique de la protéine :

Le donneur/accepteur de proton, en général un acide aminé basique (Arg ou His) ou un acide aminé acide et le nucléophile qui est toujours un acide (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Ce sont ces deux acides aminés qui sont responsables de l'hydrolyse de la liaison glycosidique et quand l'un ou l'autre est muté, la protéine ne possède plus d'activité catalytique. Par similitude, E147 et D361 semblent être les bons candidats pour porter l'activité catalytique d'OpgG. Néanmoins, les résidus E147 et D361 sont séparés d'une distance de 11 Å alors que dans le cas d'une glycosylhydrolase agissant selon un mécanisme de rétention de l'anométrie, les deux fonctions carboxyliques intervenant dans le mécanisme d'action sont fortement contraintes dans l'espace et sont séparées d'une distance de 5 Å. On peut donc s'attendre à ce qu'un troisième résidu acide participe au mécanisme d'action de notre enzyme OpgG.

Le troisième résidu est responsable de la fixation et de l'orientation du substrat, c'est le cas de R71 pour la galactomutarotase de *L. lactis*. Y156F et R158K synthétisent des OPG de même degré de polymérisation et linéaires. Étant donné leur proximité on peut s'attendre à ce que le résidu Y156 participe et aide R158 à la fixation du substrat. Il maintiendrait le substrat grâce à une interaction de type hydrophobe avec le noyau pyranique du glucose.

OpgG une nouvelle enzyme de branchement ? La protéine OpgG possède dans son domaine N-terminal une cavité électro-négative dont les dimensions (35Å X 15 Å X 15 Å) rappellent celles du site actif de l'enzyme de branchement du glycogène chez *Escherichia coli* (30,5Å X 17 Å X 17 Å) (Abad et al. 2002). Les résultats obtenus lors de la mutagenèse dirigée nous ont permis d'identifier deux résidus acides E147 et D361 indispensables à l'activité d'OpgG. Ces deux résidus sont de bons candidats pour participer à l'hydrolyse des chaînes linéaires β -1,2-glucose par un mécanisme de rétention de l'anométrie. Le domaine catalytique putatif est un domaine de type sandwich β qui n'est à ce jour pas retrouvé dans les domaines catalytiques des GH. Cependant les GH sont regroupées dans une centaine de familles et leur nombre ne cesse d'augmenter. Ces GH montrent une très grande diversité dans leur structure tridimensionnelle (Davies et al. 2005) et OpgG serait à l'origine d'une nouvelle famille. Deux mutants R158K et Y156F sont capables de synthétiser des OPG plus courts et très peu branchés. Ce phénotype conforte l'idée que la formation des branches est bien réalisée dans le périplasma et que la protéine OpgG participe

directement ou indirectement à l'activité de branchement. Dans l'hypothèse d'un rôle indirect, OpgG n'aurait que le rôle d'une glycosyl-hydrolase et hydrolyserait les chaînes linéaires de glucose en cours de synthèse. Une autre protéine périplasmique prendrait le relais pour l'activité de branchement. La recherche dans les banques de données indique que hormis OpgG, il n'existe pas d'autres glycoenzyme de localisation périplasmique chez *E. coli* mais aussi chez *E. chrysanthemi* dont on ne connait pas la fonction. Seule OpgG pourrait remplir ce rôle. Ces différents résultats montrent qu'OpgG est très vraisemblablement l'enzyme de branchement des OPG. Afin de valider ce résultat, il serait intéressant de mettre en évidence une interaction d'OpgG avec une molécule glycosidique. Quelques essais en STD-RMN et co-cristallisation ont été effectués sur divers substrats comme le β -D-glucose, sophorose (β -D-glucopyranosyl-(1,2)-D-glucopyranose) et des OPG natifs mais sans succès (Hanouille, 2004). Vraisemblablement, les expériences n'ont pas été réalisées avec le substrat adéquat. Lors du processus de biosynthèse la protéine OpgG se trouve probablement en présence d'oligosaccharides β -1,2-D-glucose linéaire en moyenne de DP=9, un tel substrat commercial n'existe pas et il faudra le fabriquer.

Le domaine C-terminal organisé en deux feuillets β adopte un repliement de type immunoglobuline tout comme le domaine CBM9 (Carbohydrate Binding Module) d'une xylanase chez *Thermotoga maritima*. Les CBM sont des domaines ne portant pas d'activité catalytique (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Ce sont uniquement des domaines d'interactions avec les substrats glycaniques de l'enzyme. Les CBM augmentent la concentration en enzyme au niveau du substrat permettant une meilleure activité catalytique (Boraston et al. 2004). Aussi le domaine N-terminal de l'enzyme de branchement du glycogène chez *E. coli* BE adopte un tel repliement. La fonctionnalité de ce domaine a été largement étudiée. BE délétée de son domaine N-terminal possède toujours une activité de branchement mais celle-ci est perturbée. Celle-ci préfère couper et transférer des chaînes plus longues. Les auteurs en ont déduit que le domaine à repliement de type immunoglobuline intervenait dans la modulation de l'activité de branchement (Binderup et al. 2002). La délétion du domaine C-terminal d'OpgG entraîne une synthèse d'OPG réduite. Ces OPG sont plus longs et relativement moins branchés. De façon similaire à BE, le domaine C-terminal d'OpgG modulerait l'activité enzymatique d'OpgG grâce à une interaction de type protéine-glycane.

3.2. OpgG une protéine d'interaction au sein du complexe multienzymatique ?

OpgG est une protéine indispensable à la synthèse des OPG. Divers résultats montrent son importance au sein de ce complexe multienzymatique.

Les expériences de mutagenèse localisée et de mutagenèse dirigée nous ont permis d'isoler deux mutants (A27 et E184D) capables de synthétiser des OPG de structure non modifiée mais dont la substitution est perturbée. L'analyse des OPG natifs en spectrométrie de masse MALDI en mode négatif (Figure II-II-9) a révélé chez le mutant A27 une diminution très significative des espèces d'OPG étant uniquement substitués par un groupement phosphoglycérol. L'activité de la phosphoglycéroltransférase I OpgB est perturbée et la substitution primaire ne se fait plus convenablement. Chez ce mutant, le gène *opgG* porté par un plasmide multicopie présente deux mutations N96D et K107E, toutes les deux situées sur la face externe de la protéine. La protéine OpgG semble interagir avec OpgB au cours de la synthèse des OPG et permettre ainsi la substitution des OPG par le phosphoglycérol.

Le domaine C-terminal d'OpgG adopte un repliement de type immunoglobuline qui est également retrouvé au niveau d'interaction protéine-protéine. Par exemple l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* est constituée de 4 domaines à repliement de type immunoglobuline qui sont responsables d'interaction homotypique entre plusieurs molécules d'invasine et d'interaction avec les intégrines à la surface de la cellule hôte déclanchant ainsi une voie de signalisation cellulaire permettant l'internalisation de la bactérie (Hamburger et al. 1999). Ainsi, le domaine C-terminal d'OpgG pourrait être un domaine d'interaction avec les autres protéines du complexe enzymatique et plus particulièrement avec OpgH. Plusieurs résultats préliminaires vont dans ce sens. Lors de son DEA, Elisabeth Kosciarz (1995) a construit un mutant d'OpgH correspondant à l'insertion d'un épitope dans la deuxième boucle périplasmique de cette GT2. Ce mutant provoque une diminution drastique de la synthèse des OPG. De plus, Xavier Hanouille a pu montrer une interaction de haute affinité avec OpgG et une séquence peptidique correspondant à la deuxième boucle périplasmique d'OpgH (Hanouille, 2004).

La délétion de la partie C-terminale de la protéine OpgG permet la synthèse d'OPG dont le degré de polymérisation est plus grand. Ce phénotype a déjà été observé lors de l'étude la protéine OpgD (Lequette et al. 2004). Une interruption du gène *opgD* ne perturbe pas la synthèse d'OPG mais ceux-ci sont plus long et relativement moins branchés. OpgD pourrait contrôler le taux de branchement des OPG en interagissant avec le domaine C-terminal d'OpgG. L'obtention de la structure tridimensionnelle d'OpgD aurait pu nous apporter quelques informations mais malheureusement les expériences de diffraction aux rayons X n'ont pas abouti.

Le domaine C-terminal d'OpgG est faiblement conservé. Seuls 5 résidus D430, R472, E487, W503 et Y505 dans la séquence primaire d'*E. coli* sont conservés chez les autres OpgG des protéobactéries (Figure II-II-8). L'obtention de la structure tridimensionnelle nous a permis de visualiser leur position. Nous avons ainsi remarqué que les résidus W503 et Y505 ne sont pas exposés à la surface. Ils semblent participer à un contact avec le domaine N-terminal et en particulier avec les résidus W288, R289, P290. Ils favoriseraient la mise en conformation de la protéine OpgG (Figure II-II-21). Par contre, les trois autres résidus D430, R472 et E487 (Figure II-II-8) sont situés à la surface du domaine C-terminal. Ils seraient éventuellement de bons candidats pour interagir très spécifiquement avec d'autres protéines du complexe multienzymatique ou avec les OPG (Figure II-II-22).

La protéine OpgG apparaît comme la protéine coordinatrice du complexe multienzymatique. OpgG interagirait avec les différents acteurs de ce complexe permettant ainsi une synthèse performante des OPG.

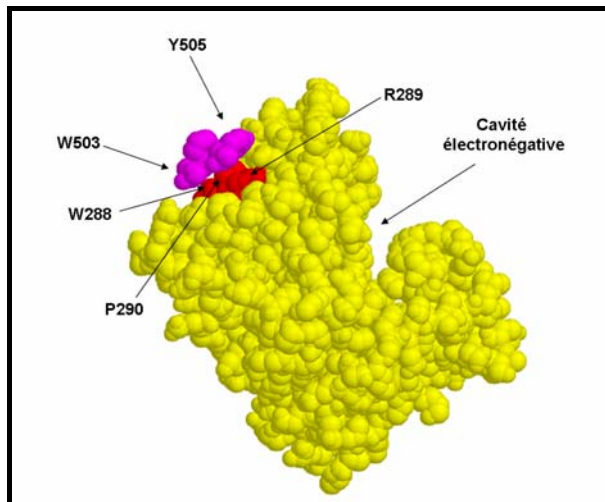


Figure II-II-21 : Résidus probablement impliqués dans la mise en conformation d'OpgG. En jaune, le domaine N-terminal d'OpgG. En rouge, les résidus conservés W288, R289, P290 du domaine N-terminal. En magenta, les résidus conservés W503 et Y505 du domaine C-terminal.

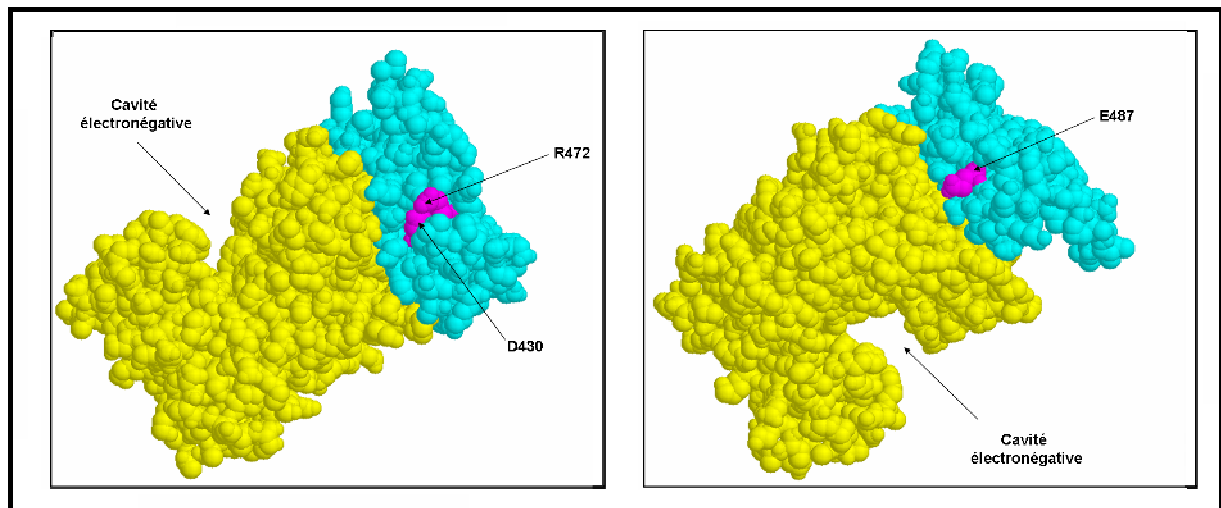


Figure II-II-1-22: Les résidus conservés du domaine C-terminal exposés à la surface de la protéine OpgG. En jaune, le domaine N-terminal et en cyan, le domaine C-terminal. La localisation des résidus conservés D430, R472 et E487 est représentée en magenta.

3.3. Modèle de biosynthèse des OPG, le rôle d'OpgG.

Ces différents résultats nous permettent d'approfondir un modèle de biosynthèse du squelette glucanique des OPG chez *E. coli*. Ce modèle fait intervenir un complexe multienzymatique. La protéine OpgH, une GT2 transmembranaire, utilise l'UDP-glucose cytoplasmique comme donneur de sucre et permet la synthèse en continue d'un squelette linéaire β -1,2 glucose. Cette protéine possède dans sa séquence primaire des homologies avec les transporteurs de type ABC. OpgH permettrait le transfert de la chaîne naissante en cours de synthèse à travers la membrane cellulaire.

La protéine OpgG pourrait participer au transfert de la chaîne naissante en interagissant avec son domaine à repliement de type immunoglobuline avec la deuxième boucle périsplasmique d'OpgH. Le domaine C-terminal d'OpgG possède des homologies structurales avec les CBM9 et pourrait se fixer à l'extrémité réductrice de la chaîne en cours de synthèse.

Le domaine N-terminal possède une cavité électro-négative qui porte les résidus E147 et D361 indispensables à l'activité d'OpgG. Ce domaine catalytique porterait l'activité de branchement. OpgG serait une enzyme processive. R158 aurait un rôle dans l'orientation du substrat, à savoir les chaînes β -1,2-D-glucose en cours de synthèse. Y156 participerait à fixation et à la stabilité du substrat via des interactions hydrophobes faisant intervenir son noyau aromatique. Aussi, de façon similaire aux GH, les résidus acides E147 et D361 participeraient au mécanisme d'hydrolyse de la chaîne linéaire β -1,2 glucose par un mécanisme de rétention de l'anométrie libérant un résidu de glucose en anométrie β qui sera transféré en β -1,6 sur cette même chaîne pour former les branches (Figure II-II-23). Ce mécanisme permet d'expliquer le phénotype obtenu pour les mutants R158K et Y156F. Une mauvaise orientation des chaînes β -1,2-D-glucose dans le domaine catalytique d'OpgG va perturber considérablement l'activité de branchement d'OpgG. Cette perturbation dans l'orientation du substrat favoriserait son activité de glycosyl-hydrolase et des OPG plus courts et très peu branchés seraient ainsi libérés.

Les protéines OpgG sont en concentration limitante, la protéine OpgG resterait attachée sur le glucane partant et une autre molécule OpgG prendrait le relais (Figure II-II-23).

La protéine OpgG pourrait également interagir avec les autres protéines du complexe. Le domaine C-terminal d'OpgG adopte un repliement de type immunoglobuline et interagirait avec OpgD. Cette interaction permettrait à OpgD de moduler l'activité de branchement. La délétion du domaine C-terminal d'OpgG ou la délétion d'OpgD empêcherait cette régulation et la cinétique d'OpgG en serait perturbée. Celle-ci serait plus lente et les OPG libérés seraient de degré de polymérisation en moyenne plus grand et seraient relativement moins branchés. OpgG interagirait aussi avec OpgB. OpgB pourrait ainsi initier la substitution des OPG.

Le modèle de biosynthèse des OPG et notamment le rôle d'OpgG peut diverger chez les autres protéobactéries. L'arbre phylogénétique réalisé à partir d'un alignement de 42 séquences primaires de protéines OpgG et OpgD dévoile plusieurs groupes (Lequette, 2004). Il est intéressant de noter qu'OpgG_{Eco} d'*E. coli* et OpgG_{Ech} d'*E. chrysanthemi* sont retrouvées dans un même ensemble. OpgG_{Eco} et OpgG_{Ech} ont des séquences en acides aminés très proches (Figure II-II-8) et elles synthétisent des OPG dont le squelette a exactement la même structure. La molécule moyenne est constituée de 9 résidus de glucose avec 3 branches. On s'attend à ce que la protéine OpgG fonctionne de la même façon chez ces deux espèces. OpgG_{Eco} et OpgG_{Ech} reconnaîtraient le même substrat, les cinétiques des réactions enzymatiques seraient similaires. Un deuxième groupe un peu plus éloigné dans la parenté contient OpgG_{Pa} de *P. aeruginosa* (Figure II-II-24). Cette bactérie synthétise des OPG de structure semblable aux OPG d'*E. coli* mais ces OPG sont légèrement plus courts et moins branchés. La cinétique de l'enzyme OpgG_{Pa} et/ou l'orientation du substrat diffèrent sans doute par rapport à OpgG_{Eco} et OpgG_{Ech}. OpgG_{Pa} aurait une activité glycosylhydrolase plus importante et transférerait moins de résidus de glucose en position β -1,6. Enfin, OpgG_{Rso} de *R. solanacearum* et OpgG_{Rsp} de *R. sphaeroides* sont de plus en plus éloignés par rapport à OpgG_{Eco} (Figure II-II-8) (Figure II-II-24) Chez ces espèces, OpgG est également responsable de la synthèse d'OPG mais ces OPG sont dépourvus de branches et sont cycliques. Dans ce cas, OpgG n'aurait plus

d'activité de glycosylhydrolase mais aurait seulement le rôle de transférase et permettrait l'étape de cyclisation.

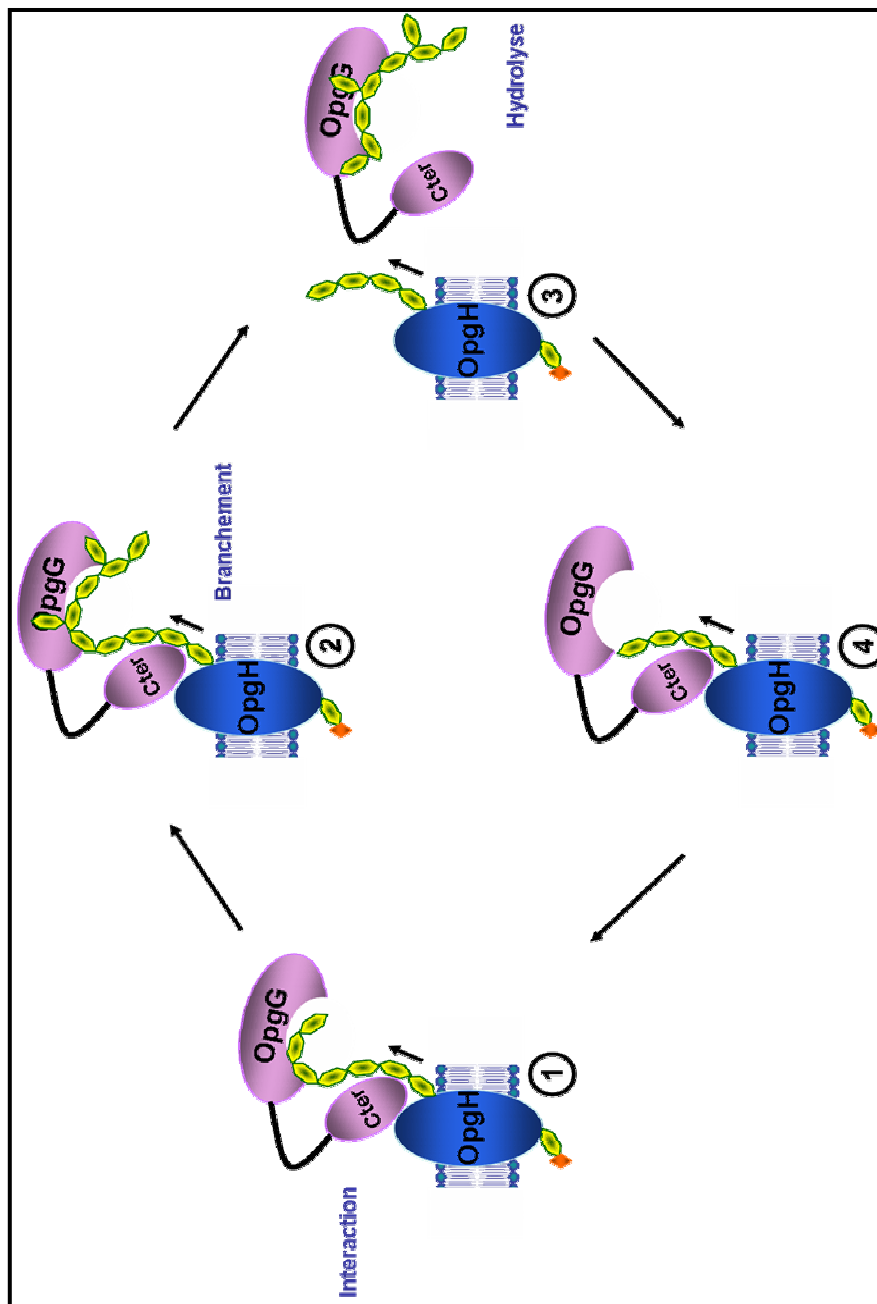


Figure II-II-23 : Modèle de biosynthèse du squelette glucosidique des OPG chez *E. coli*.

1 : OpgH catalyse le squelette linéaire β -1,2-D-glucose (hexagone jaune) à partir de l'UDP-glucose cytoplasmique (losange orange), OpgG interagit avec OpgH et aide au transfert de la chaîne naissante de glucose dans le périplasma.

2 : OpgG hydrolyse un résidu de glucose à une extrémité de la chaîne linéaire en cours de synthèse et transfère ce résidu en β -1,6.

3 : Les contraintes deviennent trop importantes et la protéine OpgG effectue seulement l'étape d'hydrolyse. Une molécule d'OPG liée à la protéine OpgG est libérée dans le périplasma

4 : Une autre protéine OpgG prend le relais et interagit avec OpgH.

C'est par soucis de clarté que les domaines N-terminal et C-terminal ont été séparés. On peut penser, au contraire, que ces domaines sont solidaires.

III. Conclusions et perspectives

Cette thèse comportait deux parties :

Une première partie en collaboration avec Yannick Lequette consacrée à la mise en évidence des OPG chez un pathogène puissant *P. aeruginosa*.

Une deuxième partie consacrée à l'étude par mutagenèse d'une protéine indispensable à la synthèse des OPG : OpgG d'*E. coli*.

P. aeruginosa produit des OPG appartenant à la famille I. Ces OPG sont osmorégulés et sont nécessaires à la maturation des biofilms dans un milieu de faible osmolarité. Comme chacune des espèces décrites pour synthétiser des OPG de la famille I, la biosynthèse de ces molécules fait intervenir l'opéron *opgGH*. Chez *P. aeruginosa*, cet opéron code des protéines qui présentent 82% et 74% de similitude avec les protéines OpgG et OpgH d'*E. coli*. *opgH_{Pa}* coderait une glycosyltransférase transmembranaire de type 2 et permettrait la synthèse du squelette linéaire composé de résidus de glucose liés en β -1,2. *opgG_{Pa}* coderait une protéine périplasmique dont le rôle exact dans la biosynthèse des OPG reste à déterminer. Ainsi, *E. coli* a été utilisée comme modèle d'étude pour approfondir nos connaissances sur la protéine OpgG. Les expériences de mutagenèse localisée et de mutagenèse dirigée ont permis d'isoler plusieurs mutants dont le phénotype a permis de répondre à quelques questions. La protéine OpgG apparaît comme la protéine clef du complexe multienzymatique. Elle interagirait avec les différents acteurs de ce complexe protéique : OpgH, OpgB et OpgD. Mais OpgG ne serait pas qu'une simple protéine d'interaction. Elle est constituée de deux domaines structuraux à repliement de type sandwich β et présente des homologies avec des protéines intervenant dans le métabolisme des glycanes. Le domaine N-terminal délimite une cavité fortement électro-négative constituée de résidus acides responsable de son activité. OpgG est très vraisemblablement l'enzyme de branchement des OPG. Le domaine C terminal adopte repliement de type immunoglobuline et interagit avec les OPG en cours de synthèse et/ou avec les protéines OpgH et OpgD. Ce domaine régule ainsi cette activité de branchement.

Il reste à montrer l'interaction d'OpgG avec les OPG. Les premières expériences ont apporté un résultat négatif mais nous n'avons pas à disposition le substrat putatif d'OpgG. Le double mutant *opgGY156FΔopgD* serait un bon candidat pour synthétiser en assez grande quantité des OPG linéaires non branchés de degré de polymérisation moyen de 8,9,10 résidus. L'obtention de ce substrat nous permettrait de reprendre les expériences d'interaction d'OpgG avec les glucanes et une stratégie impliquant le Biacore pourrait être envisagée. La cocrystallisation d'OpgG avec ce substrat pourrait mettre en évidence les acides aminés et le type de liaison impliqués dans la fixation du substrat. Nous pourrions, *in vitro*, envisager la formation des branches par OpgG.

L'obtention de la structure tridimensionnelle d'OpgD par cristallographie et diffraction des rayons X a échoué. Nous restons persuadé que la détermination de cette structure répondrait à certaines de nos questions. Il sera envisagé d'utiliser la RMN comme nouvelle stratégie.

OpgG et OpgH sont les deux protéines indispensables à la synthèse de facteurs de virulence intervenant dans le processus de pathogenèse dans le règne végétal et le règne animal : les OPG. Nous pensons que la protéine OpgG est une cible potentielle de futurs agents antibactériens. En effet, OpgG est plus facile d'accès que le domaine glucosyltransférase d'OpgH car de localisation périplasmique. De plus, cette protéine très conservée chez les protéobactéries ne possède pas d'équivalents chez les eucaryotes. Il est important de préciser le type d'interaction de cette protéine avec les OPG et les autres membres du complexe multienzymatique afin de mettre au point des inhibiteurs.

IV. Matériels et méthodes

1. Souches et Milieux

1.1. Génotype des souches et plasmides utilisés

Les souches et les plasmides d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* sont respectivement décrits dans les tableaux IV-1 et IV-2.

| | Génotype et caractéristique | Source et référence |
|---------|---|---------------------------|
| Souches | | |
| JM83 | $\Delta(lac-pro)$, <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ($\phi 80\Delta lacZ-M15$) | Vieira et al. 1982 |
| DF214 | <i>his</i> , <i>pgi::Mu</i> , $\Delta(zwf-edd)1$, <i>eda-1</i> , <i>rpsL</i> | Vinopal et al. 1975 |
| NFB702 | $\Delta(lac-pro)$, <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ($\phi 80\Delta lacZ-M15$ <i>mdoG202::neo</i>) | Loubens et al. 1993 |
| NF724 | DF214, <i>mdoG202::neo</i> | Lacroix et al. 1991 |
| NFB1152 | NFB702(pNF424) | Collection du laboratoire |
| NFB1516 | NFB702(pNF595) | Cette étude |
| NF1527 | DF214(pNF595) | Cette étude |
| NF1528 | NFB702(pNF1003) | Cette étude |
| NF1529 | NFB724(pNF1003) | Cette étude |
| NFB1660 | NFB702(pNF1096) | Cette étude |
| NFB1662 | NFB702(pNF1097) | Cette étude |
| NFB1664 | NFB702(pNF1098) | Cette étude |
| NFB1666 | NFB702(pNF1099) | Cette étude |
| NFB1671 | NFB702(pNF1100) | Cette étude |

| | | |
|--------------|---|---------------------------|
| NFB1673 | NFB702(pNF1101) | Cette étude |
| NFB1686 | NFB702(pNF1109) | Cette étude |
| BL21DE3 | F ⁻ , <i>opmT</i> , <i>hsdS</i> '(r ⁻ m ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3 | Grodberg et al. 1988 |
| NFB1658 | BL21DE3(pNF1095) | Collection du laboratoire |
| | | |
| Plasmides | | |
| pNF244 | <i>opgGH</i> dans pUC8, Amp ^r | Lacroix et al. 1989 |
| pNF424 | pNF244 avec mutation <i>MluI</i> dans <i>opgG</i> | Debarbieux, 1995 |
| pNF595 | <i>opgG</i> dans pUC19, Amp ^r | Collection du laboratoire |
| pNF1003 | pNF595 avec les mutations N96D et K107E dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1096 | pNF595 avec la mutation E183D dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1097 | pNF595 avec la mutation E184D dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1098 | pNF595 avec la mutation D361V dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1099 | pNF595 avec la mutation E147D dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1100 | pNF595 avec la mutation Y156F dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1101 | pNF595 avec la mutation R158K dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pNF1109 | pNF595 avec la mutation D146E dans <i>opgG</i> | Cette étude |
| pET-24 d (+) | Kan ^r | Novagen |
| pNF1095 | <i>opgD</i> dans pET-24 d (+) | Collection du laboratoire |
| | | |

Tableau IV-1 : Génotype des souches et caractéristiques des plasmides d'*E. coli*.

| | Génotype et caractéristique | Source et référence |
|-----------|--|-----------------------|
| Souches | | |
| PA14 | Sauvage | Rahme et al. 2000 |
| YL119 | <i>opgGH_{Pa}::gm, Gm^r,</i> | Lequette et al 2006 |
| SMC1759 | <i>ndvB ::neo ; Kan^r</i> | Mah et al. 2003 |
| | | |
| Plasmides | | |
| pUCP18 | pUCP18 vecteur contenant l'origine de répllication de <i>P. aeruginosa</i> , Cb ^r | Schweizer et al. 1991 |
| pYL205 | Opéron <i>opgGH_{Pa}</i> dans pUC18 | Lequette et al. 2006 |
| | | |

Tableau IV-2 : Génotype des souches et caractéristique des plasmides de *P. aeruginosa*.

1.2. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

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

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la turbidité à 620 nm. Une densité optique de 0,6 correspond à $6 \cdot 10^8$ bactéries/mL La composition des milieux est décrite ci-dessous :

Le Milieu LB, Luria Broth (Miller, 1992). L'omission de NaCl permet d'obtenir un milieu d'osmolarité réduite à 150 mosM.

Le Milieu 63 (Miller, 1992) est complété par les métabolites nécessaires à la croissance des différentes souches : acides aminés et base azotées à 40 mg/mL, thiamine à 2 mg/mL et sources de carbone à 0,2%.

Le Milieu LOS (Kennedy, 1982), milieu de basse osmolarité se compose de K_2PO_4 1mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1,5mM, $MgCl_2$ 0,08mM, $FeSO_4$ 0,5mg/L, thiamine 2mg/L, acides aminés de caséine 5g/L. Ce milieu est ajusté à pH 7,2 avec du Tris (1M) et complétement si nécessaire. L'osmolarité de ce milieu est de 66 mosM et peut être augmentée par l'ajout de NaCl (4M).

Ces milieux peuvent être solidifiées par l'ajout d'Agar à 15g/L. Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes : ampicilline (Amp), 50 μ g/mL ; kanamycine (Kan) 50 μ g/mL ; chloramphénicol (Cml), 15 μ g/mL pour *E. coli* et carbenicilline (Cb) 150 μ g/mL, gentamicine (Gm) 100 μ g /mL pour *P. aeruginosa*.

2. Techniques de génétique

2.1 Préparation des cellules compétentes

La méthode de Chung et al. (1989) a été utilisée. Les cellules effectuent leur croissance dans le milieu LB jusqu'à atteindre $4 \cdot 10^8$ cellules/mL. Les bactéries sont centrifugées à 1000g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans $1/10^e$ du volume initial par LB avec 10% de PEG (3500 ou 8000), 5% (vol/vol) DMSO 20-50 mM, $MgCl_2$, pH final de 6,5. 0.1 mL de ces cellules sont transférées dans des tubes de poly-propylène et stockées à -80°C.

2.2 La transformation

Les cellules sont mélangées avec des volumes variables de ligation ou d'ADN plasmidique et placées pendant 30 min dans la glace. 800 μ L de LB sont ensuite rajoutés et les cellules sont incubées à 30°C pendant 1h. Les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé en présence de l'antibiotique adéquat.

3. Techniques de biologie moléculaire

3.1. Extraction et purification d'ADN

L'ADN plasmidique est extrait selon la méthode de lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979). Le kit Quiagen Mini ou Midipreps a été utilisé dans certain cas, en particulier lors des préparations destinées au séquençage.

3.2. Enzyme de restriction et de modification

Les endonucléases de restriction (Biolabs) sont utilisées à raison de 3-5 u/μg d'ADN selon les conditions indiquées par le fournisseur.

La réaction de ligation est réalisée grâce à l'ADN-ligase du bactériophage T4 (Biolabs) dans le tampon fourni. Le mélange de ligation est incubé à 4°C pendant 18-24h.

La phosphatase alcaline provenant d'intestin de veau (Promega) a été utilisée à raison de 1u/μg d'ADN. La réaction s'est effectuée à 37°C pendant 30 min.

3.3. Electrophorèse

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1% (Quantum appligene) en tampon TAE (40mM Tris-acétate, 1mM EDTA) en présence de BET (bromure d'éthidium 1μg/mL). La migration est effectuée pendant 1h à 90V.

Les bandes sont extraites et sont purifiées après migration sur gel à partir du kit Nucleospin extract (Macherey Nagel).

Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le « Smart ladder » de New England Biolabs.

3.4. Mutagenèse localisée par PCR dégénérée

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50 μ L à partir de 20 ng de pNF244, avec 2,5 unités de l'ADN polymérase Taq (Promega) pour 35 cycles (94°C pendant 15 sec, 47°C pendant 15sec, 72°C pendant 15 sec) précédés de 2 min de dénaturation à 94°C et finissant par 5 min d'extension à 72°C. La réaction de PCR est réalisée dans les conditions suivantes : $MgCl_2$ 7mM, $MnCl_2$ 0,5 mM, [dCTP]= [dTTP]= 1mM, [dATP]= [dGTP]= 0,2mM (Kenney et Churchward, 1996). Les amorces utilisées pour l'amplification contiennent un site unique de restriction et sont représentées dans le tableau IV-3.

3.4.1. Stratégie de clonage

Les fragment A de 311 pb, B de 418 pb et C de 329 pb du plasmide pNF244 (Figure IV-1) ont été amplifié par PCR dégénérée (Kenney et Churchward, 1996) en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants : *opgG-XhoI-F / opgG-MfeI-R* ; *opgG-SacII-F / opgG-NcoI-R* ; *opgG-NcoI-F / opgG-MluI-R* (Tableau IV-3). Les fragment A, B et C ont été ensuite digérés respectivement par les couples d'enzymes de restriction *XhoI / MfeI* ; *SacII / NcoI* et *NcoI / MluI* et clonés dans pNF595 (Figure 2B) contenant le gène *opgG* préalablement coupé par ces mêmes enzymes. Nous avons utilisé pour la transformation la souche NF702 qui possède une mutation non polaire du gène *opgG* par insertion d'une cassette *neo*.

3.5. Mutagenèse dirigée par PCR

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50 μ L à partir de 20 ng du plasmide pNF595, avec 2,5 unités de Taq polymérase (Eppendorf) pour 35 cycles (94°C pendant 15 sec, 47°C pendant 15sec, 72°C pendant 15 sec) précédés de 2 min de dénaturation à 94°C et finissant par 5 min d'extension à 72°C. Les amorces utilisées pour introduire les différentes mutations sont décrites dans le tableau IV-3.

3.5.1. Stratégie de clonage

3.5.1.1. Construction du mutant D146E

L'introduction de la mutation D146E fait intervenir un clonage en trois fragments. Le produit de PCR utilisant les amorces *opgG-XhoI-F* et *DraI-opgG-R* est digéré par le couple d'enzyme *XhoI* et *DraI*. Le fragment PCR utilisant les amorces D146E-*opgG-F* et *opgG-NcoI-R* est digéré par *DraI* et *NcoI*. Ces deux fragments sont ensuite clonés dans le plasmide pNF595 digéré par *XhoI* et *NcoI* générant le plasmide pNF1109.

3.5.1.2. Construction du mutant E147D

L'introduction de la mutation E147D fait intervenir la même stratégie de clonage. Le produit de PCR utilisant les amorces *opgG-XhoI-F* et *DraI-opgG-R* est digéré par le couple d'enzyme *XhoI* et *DraI*. Le fragment PCR utilisant les amorces E147D-*opgG-F* et *opgG-NcoI-R* est digéré par *DraI* et *NcoI*. Ces deux fragments sont ensuite clonés dans le plasmide pNF595 digéré par *XhoI* et *NcoI* générant le plasmide pNF1099.

3.5.1.3. Construction des mutant Y156F et R158K

L'introduction des mutations Y156F et R158K est obtenue par amplification par PCR du gène *opgG* porté par le plasmide pNF595 à partir respectivement des couples d'amorce *opgG-XhoI-F* / Y156F-*opgG-R* et *opgG-XhoI-F* / R158K-*opgG-R*. Les fragments obtenus sont ensuite digérés par les enzymes de restriction *XhoI* et *SacII* puis clonés dans le plasmide pNF595 digéré par les mêmes enzymes générant ainsi les plasmide pNF1000 et pNF1001.

3.5.1.4. Construction des mutants E183D et E184D

L'introduction des mutations E183D et E184D est obtenue par amplification par PCR du gène *opgG* porté par le plasmide pNF595 à partir respectivement des couples d'amorce E183D-*opgG-F* / *opgG-NcoI-R* et E184D-*opgG-F* / *opgG-NcoI-R*. Les produits obtenus sont ensuite digérés par les enzymes de restriction *MfeI* et *NcoI* puis clonés dans le plasmide pNF595 digéré par les mêmes enzymes de restriction générant ainsi les plasmides pNF1096 et pNF1097.

3.5.1.5. Construction du mutant D361V

Pour faciliter le clonage, un site *HpaI* a été rajouté, introduisant ainsi la mutation D361V au niveau de l'acide aspartique A361. La construction de ce mutant fait intervenir un clonage en trois fragments. Le gène *opgG* porté par le plasmide pNF595 est amplifié à partir des couples d'amorces D361V-*opgG*-F / *opgG*-*MluI*-R et *opgG*-*NcoI*-F / D361V-*opgG*-R. Les fragments obtenus sont ensuite digérés respectivement par les couples d'enzymes *HpaI* / *MluI* et *NcoI* / *HpaI* puis clonés dans le plasmide pNF595 digéré par les enzymes de restriction *NcoI* et *MluI* générant le plasmide pNF1098.

Les plasmides obtenus sont ensuite transformés dans la souche NF702 qui porte une mutation non polaire du gène *opgG*.

3.6. Séquençage nucléotidique

Le séquençage est réalisé suivant la méthode de Sanger (Sanger et al. 1977) sur un séquenceur à 96 capillaires par la société Genoscreen. Le séquençage est réalisé dans les deux sens sur des produits de PCR pour vérifier la présence des mutations dans le gène *opgG* sur les plasmides dérivés de pNF595. Les amorces *opgG*-*XhoI*-F et *opgG*-*MfeI*-R ont été utilisées pour vérifier la présence des mutations D146E, E147D, Y156F et R158K ; les amorces *opgG*-*SacII*-F et *opgG*-*NcoI*-R pour vérifier la présence des mutations E183D et E184D ; les amorces *opgG*-*NcoI*-F et *opgG*-*MluI*-R pour vérifier la présence de la mutation D361V (Tableau IV-3).

| Amorce | Séquence |
|-------------------------------|--|
| D146E- <i>opgG</i> -F | 5'CC GGT <u>TTT AAA</u> GTG CTT TAC CCG ATC AAC AGC AAA GAT AAA AAC GAA GAA ATC3' |
| E147D- <i>opgG</i> -F | 5'CC GGT <u>TTT AAA</u> GTG CTT TAC CCG ATC AAC AGC AAA GAT AAA AAC GAT GAT ATC3' |
| Y156F- <i>opgG</i> -R | 5'GC CAG GCC <u>GCG GGC</u> AGA AAG GCC ATA AAC CTG ACC TGC ACC AAT CAC GCG GAA AAA GCT G3' |
| R156K- <i>opgG</i> -R | 5'GC CAG GCC <u>GCG GGC</u> AGA AAG GCC ATA AAC CTG ACC TGC ACC AAT CAC TTT GAA ATA GCT G3' |
| E183D- <i>opgG</i> -F | 5'CTG <u>GCA ATT</u> GAT ACC GCC TTG CCA TCG GGT GAT GAA TTT C3' |
| E184D- <i>opgG</i> -F | 5'CTG <u>GCA ATT</u> GAT ACC GCC TTG CCA TCG GGT GAA GAT TTT C3' |
| D361V- <i>opgG</i> -F | 5'GAT GAA ACC AAC <u>GTT AAC</u> ATC GTC GC3' |
| D361V- <i>opgG</i> -R | 5'GC GAC GAT GTT <u>AAC GTT</u> GGT TTC ATC3' |
| <i>DraI</i> - <i>opgG</i> -R | 5'GTA AAG CAC <u>TTT AAA</u> ACC GGC AAA3' |
| <i>opgG</i> - <i>XhoI</i> -F | 5'C CCA TTC AAA <u>CTC GAG</u> TTC3' |
| <i>opgG</i> - <i>MfeI</i> -R | 5'GG CAA GGC GGT <u>ATC AAT</u> TG3' |
| <i>opgG</i> - <i>SacII</i> -F | 5'C CTT TCT GCC <u>CGC GGC</u> CTG3' |
| <i>opgG</i> - <i>NcoI</i> -R | 5'GG GTT TTC <u>CAT GGA</u> GAA GCT GCT GAC3' |
| <i>opgG</i> - <i>NcoI</i> -F | 5'GTC AGC AGC TTC <u>TCC ATG</u> G3' |
| <i>opgG</i> - <i>MluI</i> -R | 5'GA ACG ACG <u>CGT</u> TTG TTG CAC3' |

Tableau IV-3 : Amorces utilisées pour la construction des mutants de mutagenèse localisée et de mutagenèse dirigée. F et R représentent respectivement les amorces sens et antisens. Le caractère gras indique les nucléotides qui ont été modifiés pour l'introduction de la mutation désirée. Les sites de restriction utilisés pour les différents clonages sont soulignés : 5'TTTAAA3' (*DraI*) ; 5'CCGCGG3' (*SacII*) ; 5'CAATTG3' (*MfeI*) ; 5'GTTAAC3' (*HpaI*) ; 5'CTCCAG3' (*XhoI*), 5'CCATGG3' (*NcoI*) ; 5'ACGCGT3' (*MluI*).

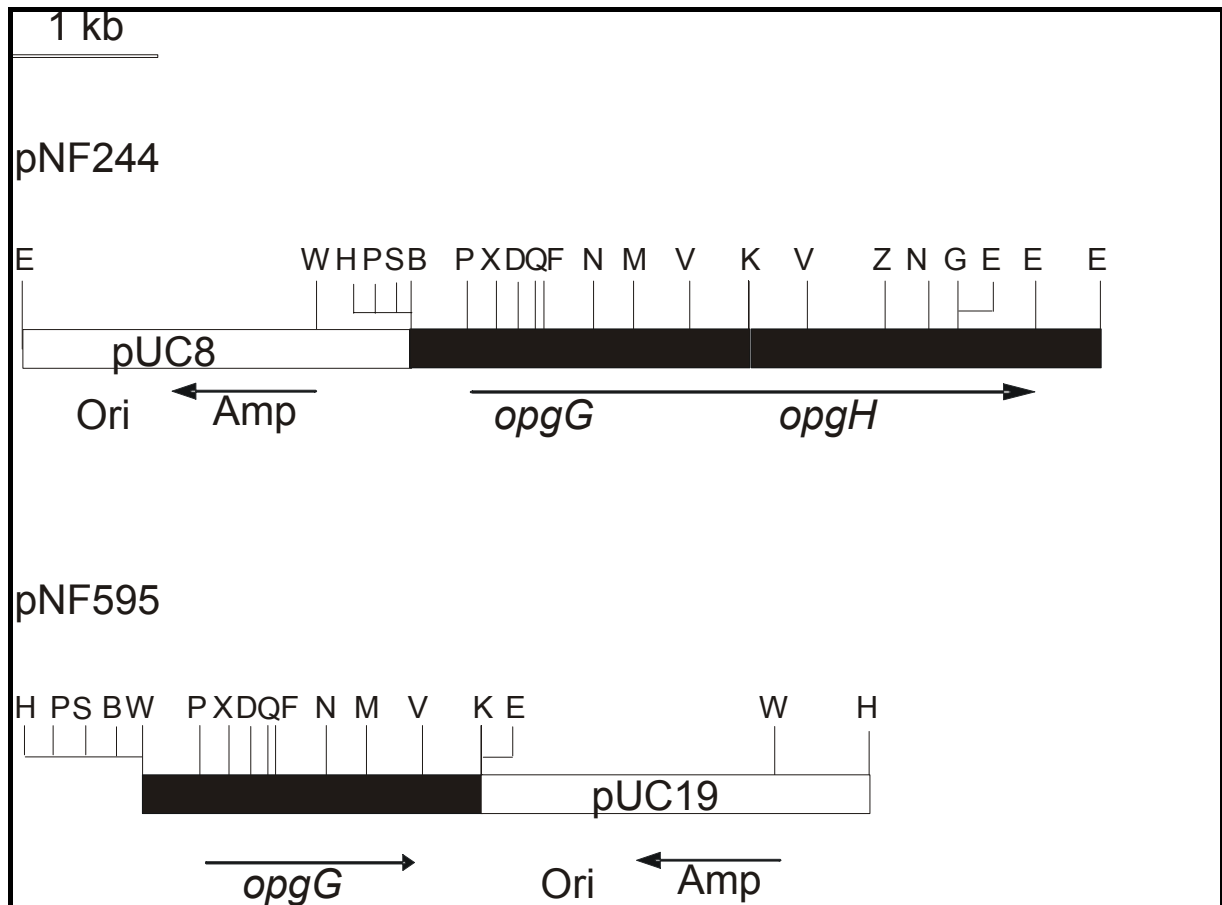


Figure IV-1 : cartes de restriction des plasmides pNF244 et pNF595. Sites de restriction : B, *Bam*HI ; G, *Bg*II ; D, *Dra*I ; E, *Eco*RI ; H, *Hind*III ; K, *Kpn*I ; M, *Mlu*I ; F, *Mfe*I ; N, *Nco*I ; P, *Pst*I ; Q, *Sac*I ; S, *Sal*I ; V, *Eco*RV ; W, *Sspl* ; X, *Xho*I.

4. Techniques Biochimiques

4.1. Marquage radioactif des OPG

Le marquage des OPG sur le glycérol est réalisé en milieu LOS contenant du 2-[³H]-glycérol (0,45 mM, 296 MBq/mmol) ou du D-U-[¹⁴C] glucose (0,24mM,125 MBq/mmol).

4.2. Extraction des OPG

L'extraction des OPG radiomarqués d'*E. coli* est réalisée en LOS à partir de cultures de 5 mL en phase stationnaire et fait intervenir de l'acide trichloroacétique (TCA) 5% dans lequel les OPG restent solubles tandis que les macromolécules sont précipitées. 0,2 volumes de TCA 30% et 0,2 volumes de serum albumine bovine (BSA) 5% sont ajoutés à un 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 volumes de suspension de charbon actif en suspension dans l'eau (50 mg/mL) sont ajoutés au surnageant récupéré précédemment, et agité à 400 rpm durant 10 min, permettant l'adsorption des OPG sur le charbon actif, puis centrifugés à 3500 g durant 5 min. Après trois rinçages à l'eau distillée, les molécules adsorbées sur le charbon actif sont extraites deux fois par 0,2 volumes de pyridine aqueuse 15% (Kennedy, 1982).

La mesure de la radioactivité des échantillons est réalisée par scintillation en phase liquide à l'aide d'un compteur ; le liquide scintillant utilisé est l'Aquasafe 300 plus (Zinsser Analytic).

L'extraction des OPG non radiomarqués d'*E. coli* se fait selon le même protocole et est réalisée à partir d'une culture en LOS en phase stationnaire de 150 mL. L'extrait pyrimidique est alors séparé en deux. Une partie est ajoutée à l'extrait pyrimidique radiomarqué constituant ainsi l'échantillon d'OPG marqués. La deuxième partie correspond à ces mêmes OPG non radioactifs.

Dans le cas de *P. aeruginosa*, l'extraction a été réalisée à partir de cultures en LOS de 350 mL en phase stationnaire.

4.3. Purification des OPG

La purification des OPG, à partir des souches d'*E. coli*, est réalisée à partir d'une chromatographie de filtration sur gel Sephadex G25 medium (Pharmacia). La colonne (1,6 x 51 cm) est équilibrée avec de l'acétate d'ammonium 0,15M dans le propanol 7% et l'échantillon est élué avec le même tampon à une vitesse de 15 mL/h. Chaque fraction comporte 1,5 mL. Les deux extraits d'OPG marqués et non radioactifs sont passés à la suite.

La purification des OPG, à partir des souches de *P. aeruginosa*, est réalisée à partir d'une chromatographie de filtration sur Biogel P6 (Pharmacia). La colonne (1,8 cm x 62 cm) est équilibrée avec de l'acétate 0,05% et l'échantillon est élué avec le même tampon à une vitesse de 10 mL/h. Chaque fraction comporte 1 mL.

La détection des OPG s'effectue soit par mesure de la radioactivité de 200 µL de chaque fraction soit par dosage à l'antrone sulfurique (antrone 2 g/L H₂SO₄ 100%) (Spiro, 1966).

4.4. Désubstitution des OPG

4.4.1. Elimination des liaisons ester (résidus de succinate)

Les OPG purifiés sur une colonne de Sephadex G25 sont traités par un volume de KOH 0,1N pendant une heure à 30°C, neutralisés par du Dowex 50X8 puis lyophilisés dans un tube Falcon.

4.4.2. Elimination des liaisons phosphodiester (résidus de phosphoéthanolamine et phosphoglycérol)

Les OPG sont alors traités par 500µL de HF pendant 72 heures à 4°C, puis neutralisés par l'ajout de cinq volumes de LiOH saturé. Le mélange est centrifugé 10min à 2000g à température ambiante. Le surnageant contenant les OPG

désubstitués est neutralisé par du Dowex 50X8. Les OPG sont dessalés par passage sur Biogel P2. La colonne (0,8 x 48 cm) a été équilibrée par de l'eau et l'échantillon est élué, avec le même tampon, dans des fractions de 1 mL.

Les OPG sont révélés à l'orcinol sulfurique après dépôt de 5 µL de chaque fraction sur plaque de silice (gel de silice 60 d'une épaisseur de 0,2 mm sur feuille d'aluminium) (Merck).

4.5. Analyse en spectrométrie de masse (MS)

Les OPG désubstitués ou non, dosés à l'antrone sulfurique, sont lyophilisés. 2 µg équivalent glucose sont analysés en MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation –Time of Fly). Les OPG désubstitués sont analysés en mode positif. La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

4.6. Analyse des OPG en chromatographie phase gazeuse (GC)

200 µg d'OPG lyophilisés entièrement désubstitués sont réduits pendant 4h à 30°C par ajout de 250 µL de BD₄K 20 mg/mL dans NH₄OH 0,05N. L'analyse des liaisons glucosidiques est effectuée selon la méthode de Paz Parente et collaborateurs. (1984). L'étape de méthylation est réalisée en présence d'iodo-méthane (Sigma-Aldrich). Les dérivés d'éthers de méthyle obtenus sont hydrolysés par l'acide trifluoroacétique (4N, 100°C, 4h) et réduits une nouvelle fois par le BD₄K. Ces dérivés sont ensuite peracétylés en présence d'anhydride acétique (Sigma-Aldrich). Les dérivés partiellement méthylés et acétylés sont analysés en GC et GC-MS. 2 µL sont injectés dans une colonne capillaire de 30 m. Des cycles de 120°C à 240°C sont réalisés par paliers de 2°C par min.

4.7. Electrophorèse monodimensionnelle

Les protéines sont analysées sur un gel de polyacrylamide 12% (acrylamide-bis-acrylamide 19 : 1) en présence de sodium dodécyle sulfate 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

V Bibliographie

Abad M. C., Binderup, K., Rios-Steiner, J., Arni, R. K., Preiss, J. & Geiger, J. H. (2002). The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme. *J Biol Chem* **277**, 42164-70.

Altabe, S. G., Talaga, P., Wieruszeski, J. M., Lippens, G., Ugalde, R. & Bohin, J. P. (1998). Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*. In *Biological nitrogen fixation for the 21st century* (Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W. E., eds.), pp. 390. Kluwer Academic, Dordrecht.

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. & Gorvel, J.-P. (2005). Cyclic β 1-2 glucan is a *Brucella* virulence factor for intracellular survival. *Nat. Imm.* **6**, 618-625

Ball, G., Durand, E., Ladeunski, A. & Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **43**, 475-485.

Bayer, M.E. (1968). Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **53**, 395-404.

Bayer, M.E. (1979). The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection, p 167-202. In M. Inouye (ed.) *Bacterial Outer Membranes, Biosynthesis, Assembly, and Function*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Bhagwat, A. A., Tully, R. E. & Keister, D. L. (1993). Identification and cloning of a cyclic beta-(1 \rightarrow 3), beta-(1 \rightarrow 6)-D-glucan synthesis locus from *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 139-44.

Bhagwat, A. A., Gross, K. C., Tully, R. E. & Keister, D. L. (1996). Beta-glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (ndvC) influencing beta-(1 \rightarrow 6) linkages. *J Bacteriol* **178**, 4635-42.

- Bhagwat, A. A., Mithofer, A., Pfeffer, P. E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J. & Keister, D. L.** (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**, 1057-64.
- Binderup, K., Mikkelsen, R. & Preiss, J.** (2002). Truncation of the amino terminus of branching enzyme changes its chain transfer pattern. *Arch Biochem Biophys* **397**, 279-85.
- Birnboim, H.C. & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.
- Bohin, J. P.** (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 11-9.
- Bohin, J. P. & Kennedy, E. P.** (1984). Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membranederived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **157**, 956-7.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J.** 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769-781.
- Bouchart, F.** (2006). Impact des mutations OPG chez *Erwinia chrysanthemi* : recherche de supresseurs et analyse protéomique des mutants. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Boucher, R.C.** (2004). New concepts of the pathogenesis of cystis fibrosis lung disease. *Eur. J.* **23**, 148-158.
- Bos, M. P. & Tommassen, J.** (2004). Biogenesis of Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr. Op; Microbiol.* **7**, 610-616.

Bowe, F., Lipps, C. J., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F. & Kusters, G. J. (1998). At least four percent of *Salmonella thyphimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Inf. Imm.* **66**, 3372-3377.

Boyd, A. & Chakrabarty, A.M. (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2355-2359.

Breedveld, M. W., Zevenhuisen, L. P. & Zehnder, A. J. (1992). Synthesis of cyclic β 1-2 glucans by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* **174**, 6336-6342

Breedveld, M. W. & Miller, K. J. (1994). Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* **58**, 145-61.

Breedveld, M. W., Hadley, J. A. & Miller, K. J. (1995). A novel cyclic β 1-2 glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**, 6346-6351

Campisano A. Schroeder, C., Schemionek, M., Overhage, J. & Rehm, B. H. A. (2006). PsID Is a Secreted Protein Required for Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Env. Microbiol.* **72**, 3066-3068

Cangelosi, G.A., Martinetti, G. & Nester, E. W. (1990). Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic beta-1,2-glucan, *J. Bacteriol.* **172**, 2172-2174.

Cayley, D.S., Guttman, H.J., & Record Jr., M.T. (2000). Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**, 1748-1764

Chen, R., Bhagwatt, A.A., Yaklich, R. & Keister, D.L. (2002). Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic β -(1,2),(1,6)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **48**, 1008-1113.

Charnock, S. J. & Davies, G. J. (1999). Structure of the Nucleotide-Diphospho-Sugar Transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in Native and Nucleotide-Complexed Forms. *Biochemistry* **38**, 380-6385.

Ciocchini, A. E., Roset, M.S., Inon de Iannino, N. & Ulgade, R.A. (2004). Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* **186**, 7205-7213.

Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. 1989, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 2172-2175.

Cogez, V., Gak, E., Puskas, A., Kaplan, S. & Bohin, J. P. (2002). The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *Eur J Biochem* **269**, 2473-84.

Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J. & Bohin, J. P. (2001). Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **183**, 3127-33.

Cook, W. R. & Rothfield, L.I. (1994). Early stages of development of the *Escherichia coli* cell-division site. *Mol. Microbiol.* **14**, 485-495

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

Dartigalongue C., Missikias, D. & Raina, S. (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20866-20875.

Davey, M.E., Caiazza, N.C. & O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **183**, 1027-1036.

Davies, G. J., Gloster, T. M. & Henrissat, B. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr. Op. Struct. Biol.* **15**, 637-645.

Debarbieux, L., Bohin, A. & Bohin, J. P. (1997). Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 6692-8.

Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C. Camara, M., Williams, P. & Winzer, K. (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Env. Microbiol.* **8**, 1095-1104.

Dang, Y. H., Zhang, X. H., Soo, H. M., Greenberg, E. P. & Zhang, L. H. (2005). The two component response regulator PprB modulates quorum sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **56**, 1287-1301.

Dylan, T., Helinski, D.R. & Ditta, G.S. (1990). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1,2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**, 1400-1408.

Ebel W., Vaughn, G. J., Peters, H. K., 3rd & Trempy, J. E. (1997). Inactivation of mdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 6858-61.

Fiedler, W. & Rotering, H. (1988). Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **263**, 14684-9.

Friedman. L & Kolter R. (a) (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas Aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**, 675-690.

Friedman. L & Kolter R. (b) (2004). Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix, *J. Bacteriol.* **186**, 4457-4465.

Geiger, O., Russo, F. D., Silhavy, T. J. & Kennedy, E. P. (1992). Membrane-derived oligosaccharides affect porin osmoregulation only in media of low ionic strength. *J Bacteriol* **174**, 1410-3.

Goldberg, D. E., Rumley, M. K. & Kennedy, E. P. (1981). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides: a periplasmic phosphoglyceroltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5513-7.

Graham, L.L., Beveridge, T.J. & Nanninga, N. (1991). Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends. Biochem. Sci.* **16**, 328-329.

Groberg, J. & Dunn, J.J. (1988). OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245-1253.

Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. S. & Bjorkman, P. J. (1999). Crystal structure of invasine : bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**, 291-295.

Hanouille, X. (2004). Etude In Vivo de l'Activation d'une Pro-Drogue par des Mycobactéries à l'Aide de la RMN 1H HRMAS Analyse Structurale et Biochimique de OpgG de *Escherichia coli*, une Protéine Requise pour la Biosynthèse des Glucanes Périplasmiques Osmorégulés. Thèse de Doctorat, Université du droit et de la santé de Lille 2.

Hanouille, X., Rollet, E., Clantin, B., Landrieu, I., Odberg-Ferragut, C., Lippens, G., Bohin, J. P. & Villeret, V. (2004). Structural Analysis of *Escherichia coli* OpgG, a Protein Required for the Biosynthesis of Osmoregulated Periplasmic Glucans. *J Mol Biol* **342**, 195-205.

Hasin, M., & Kennedy, E.P. (1982). Role of the phosphatidylethanolamine in the biosynthesis of pyrophosphoethanolamine residues in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *J. Biol.* **257**, 12475-12477

Heck, L.W., Morihara, K., McRae, W.B. & Miller, E.J. (1896). Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* élastase. *Infect. Imm.* **51**, 115-118.

Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., and Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol.* **14**, 2395-2407.

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

Holtje, J. V., Fiedler, W., Roterling, H., Walderich, B. & van Duin, J. (1988). Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned mysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligisaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**, 3539-3541.

Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaning murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Rev.* **62**, 181-203.

Inon de Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M. & Ugalde, R. A. (1998). Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1–2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J. Bacteriol.* **180**:4392–4400.

Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R. & Wozniak, D.J. (2004). Identification of *psl*, a Locus Encoding a Potential Exopolysaccharide That Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* **186**, 4466-4475.

Jackson, B. J. & Kennedy, E. P. (1983). The biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. A membranebound phosphoglycerol transferase. *J Biol Chem* **258**, 2394-8.

Jung, Y., Park, H., Cho, E. & Jung, S. (2005). Structural analysis of a novel glycerophosphorylated alpha-cyclohexadecaoses isolated from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Carbohydr. Res.* **21**, 673-677.

Kadner (1996). Cytoplasmic membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn., 58-87

Kennedy, E. P. (1982), Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, USA, **79**, 1092-1095.

Kennedy, E. P. (1996), Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic β -D-glucans) of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn., 1064-1074.

Kenney, J.T. and Churchward, G. (1996,) Genetic analysis of the *Mycobacterium smegmatis* *rpsL* promoter, *J. Bacteriol.*, **178**, 3566-3571.

Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R., Rosenbloom, J. & Ohman D. E. (1997). Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* **272**, 9984-9989

Kipsis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* **36**, 78-91.

Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C. & Pechère, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signalling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**, 5990-5996.

Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G. & Stathopoulos, C. (2005). Mechanisms of proteine export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* **187**, 4306-4314.

Kosciarz, E. (1995). Approche génétique des interactions d'une glycosyltransférase membranaire avec d'autres protéines. DEA de l'Université des Sciences et Technologie de Lille.

Kuchma, S. L., Connolly, J. P. & O'Toolr, G. A. (2005). A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 1441-1454.

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

Lacroix, J. M., Loubens, I., Tempete, M., Menichi, B. & Bohin, J. P. (1991). The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol Microbiol* **5**, 1745-53.

Lacroix, J.-M., Tempête, M., Menichi, B., and Bohin, J.-P. (1989). Molecular cloning and expression of a locus (*mdoA*) implicated in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**, 1173-1182.

Lacroix, J-M. (1989). Etude génétique et physiologique de la régulation osmotique de la biosynthèse du MDO chez *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.

Lanfroy, E. and Bohin, J.-P. (1993), Physical map location of *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I, *Journal of Bacteriology*, **175**, 5736-5737.

Lazzaroni, J.-C., Germon, P., M.-C. Ray & Vianney. A. (1999). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS.* **177**, 191-197.

Lequette, Y. (2002). Biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés chez *Escherichia coli* : analyse fonctionnelle des protéines MdoG et MdoH et caractérisation de deux nouvelles activités. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.

Lequette, Y., Odberg-Ferragut, C., Bohin, J. P. & Lacroix, J. M. (2004). Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. *J Bacteriol* **186**, 3695-702.

Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J. M. & Bohin, J. P. (1993). Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **10**, 329-40.

Ma, Q., Zhaia, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M. & Saier Jr., M.H. (2003). Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Bioch. Biophys. Acta*, **1611**, 223-233.

Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. and O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**, 306-310.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M.T., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M., (1999), Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model, *Cell*, **96**, 47-56.

Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004). Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development, *J. Bacteriol.* **186**, 449-4456.

Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 289-314.

McIntire, F.C., Peterson, W.H. & Richter, A.J. (1942). *J. Biol. Chem.* **143**, 491-496.

McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.

Miller, J. H. (1992), A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N. Y.

Miller, K.J. & Kennedy, E.P.(1987). Transfer of phosphoethanolamine residues from phosphatidylethanolamine to the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 682-686.

Miller, K.J., Kennedy, E.P., and Reinhold, V.N. (1986). Osmotic adaptation by gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science.* **231**, 48-51.

Minsevage, G. V., Mudgett, M. B., Stall, R. E. & Jones, J. B. (2004). Importance of *opgH_{Xcv}* of *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria in hot-parasite interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 152-161.

Narita, S; & Tokuda, H. (2006). An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Letters* **580**, 1164-1170.

Nikaido, H. (1996). Outer membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn., 29-47.

Oliver, D.B. (1996). Periplasm. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn., 88-122

Overhage, J., Schemionek, M., Webb, J. S. & Rehm, B.H.A. (2005) Expression of the *psl* Operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms: PslA Performs an Essential Function in Biofilm Formation, *Appl. Env. Microbiol.* **71**, 4407-4413

Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J. M., Robert-Baudouy, J. & Bohin, J. P. (2001). Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J Bacteriol* 183, 3134-41.

Park, J.T. (1996). The murein sacculus. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn., 48-57.

Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy Y., Montreuil, J., Fournet, B. & Ricard, G. (1984), A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion, *Carbohydrate Research*, **141**, 41-47.

Pedersen, S. S., Moller, H., Espersen, F., Sorensen, C. H., Jensen, T. & Hoiby, N. (1992). Mucosal immunity to *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis. *Apmis* **100**, 326-334.

Puvanesarajah, V. Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J. & Nester, E.W. (1985). Role for 2-linked- β -G-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**, 102-106.

Raetz, C. R. H. 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* **20**, 253-295.

Rahme, L. G., and e. al. 2000. Plants and animals share functional common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**,8815-8821.

Rajapogal, S., Eis, N., Bhattacharya, M. & Nickerson, K.W. (2003). Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential sodium dodecyl sulphate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letter* **233**, 25-31.

Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis, *Mol. Microbiol.* **156**, 309-322.

Rietschel, E.T., Kirikae, T., Shade F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seidel, U., Di Padova, F., Schreier, M & Brad, H. (1994), Bacterial endotoxin: molecular relationships and structure to activity and function. *The FASEB J.*, **8**, 217-225.

Rolin, D. B., Pfeffer, P. E., Osman, S. F., Szwegold, B. S., Kappler, F. & Benesi, A. J. (1992). Structural studies of a phosphocholine substituted beta-(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA **110**. *Biochim Biophys Acta* **1116**, 215-25.

Roset, M. S., Ciocchini, A. E., Ugalde, R. A. & Inon de Iannino, N. (2004). Molecular cloning and characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan transporter gene, and its role in virulence. *Infect. Immun.* **72**, 2263–2271

Roset, M.S., Ciocchini, A.E., Ugalde, R.A. & Inon de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* cyclic β -1, 2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J. Bacteriol.* **188**, 5003-5013.

Ruimy, R. & Andremont, A. (2004). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation* **13**, 176-184

Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christlan, J.W. & Prince, A.S. (2005). Pathogen – host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **171**, 1209-1223.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminators, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, **74**, 5463-5467.

Sara, M. & Sleytr, U.B. (2000) : S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859-868.

Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr., Fevre, M., Geremia, R. A. & Henrissat, B. (1995). Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* **177**, 1419-24.

Schweizer, H. P. (1991). *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* **97**,109-121.

Shaver, C.M. & Hauser, A.R. (2006). Interactions between effector proteins of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system do not significantly affect several measures of disease severity in mammals. *Microbiol.* **152**, 143-152.

Spiro, R.G. (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins, *Methods in Enzymology*, **8**, 3-27.

Stock, J.B., Rauch, B. & Roseman, S. (1997). Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**, 7850-7861.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187-209.

Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M. & Nikaido, H. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *J. Biol. Chem.* **281**, 16220-16229.

Talaga, P., Cogez, V., Wieruszkeski, J. M., Stahl, B., Lemoine, J., Lippens, G. & Bohin, J. P. (2002). Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **269**, 2464-72.

Talaga, P., Fournet, B. & Bohin, J. P. (1994). Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **176**, 6538-44.

Talaga, P., Stahl, B., Wieruszkeski, J. M., Hillenkamp, F., Tsuyumu, S., Lippens, G. & Bohin, J. P. (1996). Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and

Xanthomonas campestris pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. *J Bacteriol* **178**, 2263-71.

Tamber, S., Ochs, M.M. & Hancock, R.E.W. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 45-54.

Therisod, H., Weissborn, A.C. & Kennedy, E.P. (1986). An essential function for acyl carrier protein in the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **83**, 7236-7240.

Thoden, J. B. & Holden, H. M. (2002). High resolution X-ray structure of galactose mutarotase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **7**, 20854-20861.

Vanden Boom, T. & Cronan, J.E. (1989). Genetics en regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 317-343

Van Golde, L. M. G., Schulman, H. & Kennedy, E. P. (1973). Metabolism of Membrane Phospholipids and Its Relation to a Novel Class of Oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1368-1372.

Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. & Filloux A. (2005). The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* **151**, 985-997

Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **3**, 171-176.

Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**, 259-268.

Vinopal, R. T., Hillman, J. D., Schulman, H., Reznikoff, W.S. & Fraenkel, D.G. (1975). New phosphoglucose isomerase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122**, 1172-1174.

Wang, P., Ingram-Smith, C., Hadley, J. A. & Miller, K. J. (1999). Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic beta-glucan biosynthesis. *J Bacteriol* **181**, 4576-83.

Weissborn, A. C. & Kennedy, E. P. (1984). Biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides. Novel glucosyltransferase system from *Escherichia coli* for the elongation of beta 1-2-linked polyglucose chains. *J Biol Chem* **259**, 12644-51.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M. & Willims, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**, 6401-6411.

Yahr, T.L., Vallis, J.A., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. & Frank, D.W. (1998). ExoY an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13899-13904

York, W. S. (1995). A conformational model for cyclic beta-(1,2)-linked glucans based on NMR analysis of the beta-glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Research.* **278**, 205-225.

Zorreguieta, A., Cavaignac, S., Geremia, R. A. & Ugalde, R. A. (1990). Osmotic regulation of beta, (1-2) glucan synthesis in members of the family Rhizobiaceae. *J Bacteriol* **172**, 4701-4.

VI. Annexe

Annexe 1 : Fiche technique du vecteur pET24-d(+)

Annexe 2 : Hanouille X., Rollet E., Clantin B., Landrieu I., Ödberg-Ferragut C., Lippens G., Bohin J.-P. and Villeret V. 2004. Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of Osmoregulated Periplasmic Glucans, J. Mol. Biol. 342: 195-205.

pET-24a-d(+) Vectors

TB070 12/98

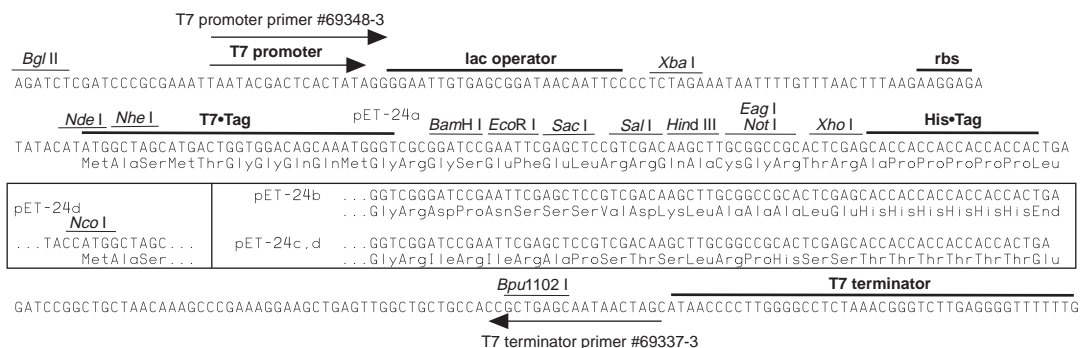
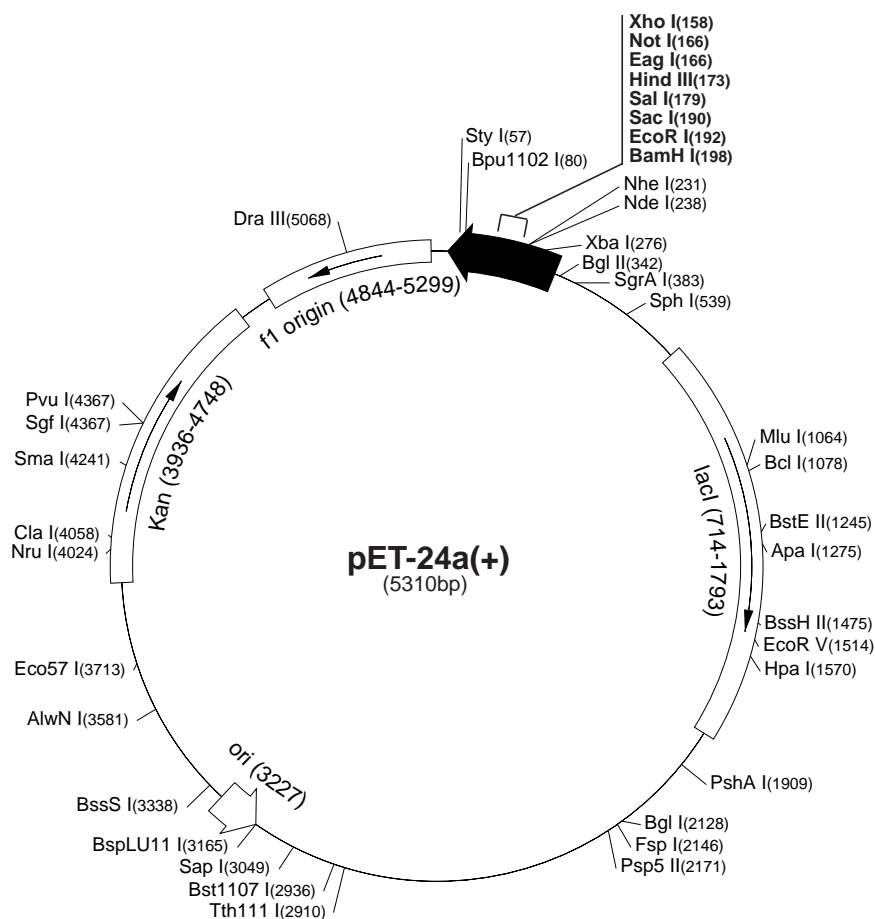
| | Cat. No. |
|-------------|----------|
| pET-24a DNA | 69749-3 |
| pET-24b DNA | 69750-3 |
| pET-24c DNA | 69751-3 |
| pET-24d DNA | 69752-3 |

The pET-24a-d(+) vectors carry an N-terminal T7•Tag[®] sequence plus an optional C-terminal His•Tag[®] sequence. These vectors differ from pET-21a-d(+) only by their selectable marker (kanamycin vs. ampicillin resistance). Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-24a(+) sequence landmarks

| | |
|--|-----------|
| T7 promoter | 311-327 |
| T7 transcription start | 310 |
| T7•Tag coding sequence | 207-239 |
| Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I) | 158-203 |
| His•Tag coding sequence | 140-157 |
| T7 terminator | 26-72 |
| <i>lac</i> I coding sequence | 714-1793 |
| pBR322 origin | 3227 |
| Kan coding sequence | 3936-4748 |
| f1 origin | 4844-5299 |

The maps for pET-24b(+), pET-24c(+) and pET-24d(+) are the same as pET-24a(+) (shown) with the following exceptions: pET-24b(+) is a 5309bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24c(+) is a 5308bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24d(+) is a 5307bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-24c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-24c(+). As a result, *Nco* I cuts pET24d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-24a(+). *Nde* I does not cut pET-24d(+). Note also that *Sty* I is not unique in pET-24d(+).



pET-24a-d(+) cloning/expression region

pET-24a(+) Restriction Sites

| Enzyme | # Sites | Locations | Enzyme | # Sites | Locations | Enzyme | # Sites | Locations |
|----------|---------|--|----------|---------|---|----------|---------|---|
| AccI | 2 | 180 2935 | BstEII | 1 | 1245 | PfiMI | 2 | 646 4630 |
| AccIII | 7 | 831 1559 1890 2674 2815 3117 4908 | BstXI | 3 | 866 995 1118 | PleI | 9 | 325 613 700 1496 3059 3544 4599 5003 5011 |
| Acil | 74 | | BstYI | 9 | 132 198 342 628 1840 2357 3806 3817 4616 | PshAI | 1 | 1909 |
| AfIII | 2 | 1064 3165 | CacBI | 40 | | Psp5II | 1 | 2171 |
| AluI | 22 | | CjeI | 26 | | Psp1406I | 4 | 726 2094 2490 4853 |
| AlwI | 13 | | CjePI | 20 | | PvuI | 1 | 4367 |
| Alw21I | 7 | 159 190 564 1048 2159 2983 3483 | Clal | 1 | 4058 | PvuII | 3 | 1664 1757 2756 |
| Alw44I | 3 | 1044 2979 3479 | CviJI | 83 | | RcaI | 3 | 462 3885 4760 |
| AlwNI | 1 | 3581 | CviRI | 22 | | RsaI | 3 | 1211 2971 4202 |
| ApaI | 1 | 1275 | DdeI | 11 | | SacI | 1 | 190 |
| ApaBI | 1 | 748 | DpnI | 21 | | Sall | 1 | 179 |
| ApoI | 6 | 192 1339 3980 4164 4870 4881 | DraIII | 1 | 5068 | SapI | 1 | 3049 |
| AvaI | 2 | 158 4239 | DrdI | 3 | 2858 3273 5023 | Sau96I | 14 | |
| AvaII | 5 | 1616 1992 2080 2171 2450 | DrdII | 2 | 787 5073 | Sau3AI | 21 | |
| BamHI | 1 | 198 | Dsal | 2 | 501 2137 | ScrFI | 21 | |
| BanI | 8 | 386 407 521 984 1703 1833 1959 5105 | EaeI | 4 | 166 372 504 1738 | SfaNI | 23 | |
| BanII | 6 | 190 448 462 1275 4022 5143 | EagI | 1 | 166 | Sfcl | 4 | 310 3430 3621 5287 |
| BbsI | 4 | 1210 1549 1923 2283 | EarI | 3 | 682 3049 4180 | Sgfl | 1 | 4367 |
| BbvI | 23 | | Ecil | 3 | 841 3239 3385 | SgrAI | 1 | 383 |
| BccI | 13 | | Eco47III | 3 | 469 1970 2419 | SmaI | 1 | 4241 |
| Bce83I | 6 | 21 1878 2048 3256 3554 3795 | Eco57I | 1 | 3713 3713 | SphI | 1 | 539 |
| BceII | 6 | 583 924 1551 3667 4686 5094 | EcoNI | 2 | 599 4279 | Sspl | 2 | 4292 4860 |
| BcgI | 9 | 160 194 228 1356 1390 1890 1924 2742 2776 | EcoO109I | 3 | 53 497 2171 | StyI | 1 | 57 |
| BclI | 1 | 1078 | EcoRI | 1 | 192 | TaqI | 15 | |
| Bfal | 7 | 70 232 277 2179 3660 3967 5219 | EcoRII | 9 | 787 1102 1642 1699 3191 3312 3325 4255 4612 | TaqII | 6 | 972 1190 1863 3067 4621 4972 |
| BglI | 1 | 2128 | EcoRV | 1 | 1514 | TfiI | 9 | 1743 2045 2215 2719 3140 4278 4334 4506 4597 |
| BglII | 1 | 342 | FauI | 17 | | ThaI | 36 | |
| BmgI | 1 | 1273 | FokI | 9 | 1110 1119 2384 2446 2524 2710 2851 4005 4611 | TseI | 23 | |
| BpmI | 4 | 902 1391 2025 2692 | FspI | 1 | 2146 | Tsp45I | 7 | 1245 2073 2604 2817 2912 4514 5241 |
| Bpu10I | 2 | 2271 4384 | GdIII | 4 | 166 372 504 1738 | Tsp509I | 20 | |
| Bpu1102I | 1 | 80 | HaeI | 6 | 792 2113 3180 3191 3643 4454 | Tth111I | 1 | 2910 |
| BsaAI | 2 | 2917 5068 | HaeII | 14 | | Tth111II | 8 | 903 1596 2626 3755 3762 3794 4203 4330 |
| BsaBI | 3 | 341 347 2362 | HaeIII | 23 | | UbaII | 18 | |
| BsaHI | 5 | 387 408 522 1021 1704 | Hgal | 11 | | VspI | 5 | 325 1749 1808 4566 4755 |
| BsaJI | 9 | 57 501 507 1699 2137 3325 4238 4239 4640 | HgiEI | 2 | 662 3751 | XbaI | 1 | 276 |
| BsaWI | 7 | 2 1383 1886 2354 3371 3518 4502 | Hhal | 46 | | XcmI | 3 | 920 1436 1454 |
| BsaXI | 2 | 1723 5016 | Hin4I | 3 | 963 4053 4595 | XhoI | 1 | 158 |
| Bsbl | 2 | 2881 4975 | HincII | 2 | 181 1570 | XmnI | 2 | 2723 4756 |
| BscGI | 11 | | HindIII | 1 | 173 | | | |
| Bsgl | 3 | 915 1115 2325 | Hinfl | 18 | | | | |
| Bsil | 1 | 3338 | HpaI | 1 | 1570 | | | |
| BsiEI | 5 | 169 1849 3081 3505 4367 | HphI | 16 | | | | |
| BsII | 23 | | Maell | 14 | | | | |
| BsmI | 2 | 4251 4328 | MaellI | 16 | | | | |
| BsmAI | 6 | 761 1166 1292 1679 2806 4383 | MbolI | 12 | | | | |
| BsmBI | 3 | 1679 2806 4383 | Mlul | 1 | 1064 | | | |
| BsmFI | 4 | 525 2066 2436 5283 | Mmel | 7 | 3380 3564 4009 4203 4565 4574 5045 | | | |
| BsoFI | 41 | | MnII | 25 | | | | |
| Bsp24I | 12 | | Msel | 25 | | | | |
| Bsp1286I | 12 | | Msil | 6 | 1116 1404 1434 2152 2347 2738 | | | |
| BspEI | 2 | 2 2354 | MspI | 29 | | | | |
| BspGI | 1 | 2691 | MspAII | 8 | 84 1094 1664 1757 2756 2875 3507 3752 | | | |
| BspLU11I | 1 | 3165 | Mwol | 39 | | | | |
| BsrI | 22 | | NarI | 4 | 387 408 522 1704 | | | |
| BsrBI | 4 | 297 3098 4766 5212 | NciI | 12 | | | | |
| BsrDI | 2 | 1111 1477 | NdeI | 1 | 238 | | | |
| BsrFI | 7 | 374 383 750 1962 2122 4321 5169 | NgoAIV | 4 | 374 1962 2122 5169 | | | |
| BssHII | 1 | 1475 | NheI | 1 | 231 | | | |
| Bst1107I | 1 | 2936 | NlaIII | 25 | | | | |
| | | | NlaIV | 21 | | | | |
| | | | NotI | 1 | 166 | | | |
| | | | NruI | 1 | 4024 | | | |
| | | | Nsil | 2 | 4217 4483 | | | |
| | | | NspI | 4 | 539 2510 2802 3169 | | | |
| | | | Pfi1108I | 1 | 1951 | | | |

Enzymes that do not cut pET-24a(+):

| | | | | |
|--------|-------|----------|-------|-------|
| AatII | AfilI | AgeI | AscI | AvrII |
| BaeI | BalI | BseRI | BspMI | BsrGI |
| Bsu36I | DraI | Eam1105I | FseI | KpnI |
| MscI | MunI | NcoI | NspV | Pacl |
| PmeI | PmlI | PstI | RleAI | RsrII |
| SacII | Scal | SexAI | Sfil | SnaBI |
| SpeI | SrfI | Sse8387I | StuI | SunI |
| Swal | | | | |

Structural Analysis of *Escherichia coli* OpgG, a Protein Required for the Biosynthesis of Osmoregulated Periplasmic Glucans

Xavier Hanouille^{1*}, Eglantine Rollet², Bernard Clantin¹
Isabelle Landrieu¹, Carmen Ödberg-Ferragut², Guy Lippens¹
Jean-Pierre Bohin² and Vincent Villeret^{1*}

¹UMR 8525 CNRS, Institut de Biologie de Lille, Université de Lille II and Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP447, 59021 Lille Cedex, France

²Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle CNRS UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) G protein (OpgG) is required for OPGs biosynthesis. OPGs from *Escherichia coli* are branched glucans, with a backbone of β -1,2 glucose units and with branches attached by β -1,6 linkages. In Proteobacteria, OPGs are involved in osmoprotection, biofilm formation, virulence and resistance to antibiotics. Despite their important biological implications, enzymes synthesizing OPGs are poorly characterized. Here, we report the 2.5 Å crystal structure of OpgG from *E. coli*. The structure was solved using a selenomethionine derivative of OpgG and the multiple anomalous diffraction method (MAD). The protein is composed of two β -sandwich domains connected by one turn of 3_{10} helix. The N-terminal domain (residues 22–388) displays a 25-stranded β -sandwich fold found in several carbohydrate-related proteins. It exhibits a large cleft comprising many aromatic and acidic residues. This putative binding site shares some similarities with enzymes such as galactose mutarotase and glucodextranase, suggesting a potential catalytic role for this domain in OPG synthesis. On the other hand, the C-terminal domain (residues 401–512) has a seven-stranded immunoglobulin-like β -sandwich fold, found in many proteins where it is mainly implicated in interactions with other molecules. The structural data suggest that OpgG is an OPG branching enzyme in which the catalytic activity is located in the large N-terminal domain and controlled *via* the smaller C-terminal domain.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: carbohydrates; periplasmic osmoregulated glucans; biosynthesis; X-ray structure; branching enzymes

*Corresponding authors

Introduction

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are important components of the bacterial envelope of many Proteobacteria. OPGs from different species share several structural characteristics: glucose is the sole component sugar and residues are linked essentially by β -glycosidic bonds.^{1,2} OPGs of *Escherichia coli* are heterogeneous in size, varying from five to 12 glucose residues, with the principal

species containing eight or nine glucose residues. Their structures are highly branched, the backbone consisting of β -1,2 linked glucose units to which the branches are attached by β -1,6 linkages. They are substituted to various degrees by *sn*-1 phosphoglycerol, phosphoethanolamine, and succinic acid O-ester. Very similar structures with only slight variations in the degree of polymerization have been found in other members of the gamma subdivision of the Proteobacteria, including *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas syringae*.

In *E. coli*, the *opgGH* (or *mdoGH*) operon encodes two proteins (OpgG and OpgH) that are both required for the assembly of the polyglucose structure of OPGs.³ OpgH is a 97 kDa glycosyltransferase spanning the cytoplasmic membrane.⁴ The *in vitro* products of this glycosyltransferase⁵ are linear oligomers of β -1,2-linked glucose units

Abbreviations used: OPGs, osmoregulated periplasmic glucans; SeMet-OpgG, selenomethionine OpgG derivative; Ig, immunoglobulin; mBE, maize endosperm branching enzyme; MAD, multiple anomalous diffraction method; EPS, exopolysaccharide(s).

E-mail addresses of the corresponding authors: vincent.villeret@ibl.fr; xavier.hanouille@ibl.fr

Titre : La biosynthèse des glucanes périplasmiques osmorégulés : de la démonstration des gènes impliqués chez *Pseudomonas aeruginosa* à l'analyse structurale de protéines impliquées chez *Escherichia coli*

Chez *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* et *Escherichia coli*, l'opéron *opgGH* code les deux protéines indispensables à la synthèse des OPG. Une première approche a permis de montrer que c'est le locus *opgGH* et non le locus *ndvB* qui est responsable de la synthèse des OPG chez *Pseudomonas aeruginosa*. L'absence d'OPG perturbe la formation des biofilms. Les OPG de *P. aeruginosa* sont constitués de 5 à 10 résidus de glucose formant un squelette linéaire lié en β -1,2 avec des branches liées en β -1,6. Ces OPG sont très semblables à ceux trouvés chez *E. coli*. Chez cette bactérie OpgH, une glucosyltransférase de type 2 située dans la membrane interne, catalyse la biosynthèse du squelette linéaire à partir de l'UDP-glucose. OpgG, une protéine périplasmique, interagirait avec OpgH pour la synthèse du squelette et aurait un rôle dans la formation des branches. Chez *E. coli*, OpgD, le produit d'un paralogue d'*opgG*, contrôlerait la machinerie de biosynthèse des OPG. Les mutants *opgG* ne forment plus d'OPG, les mutants *opgD* ont des OPG de structure altérée. Etant donné les fortes similitudes dans leur séquence primaire, nous avons entrepris de cristalliser OpgG et OpgD afin de mettre en évidence des différences structurales pour comprendre le rôle de ces deux protéines. Les cristaux d'OpgD obtenus diffractent avec une trop faible résolution pour obtenir une carte de densité électronique. La structure tridimensionnelle d'OpgG (établie par Hanouille et al. en 2004) et les stratégies de mutagenèse localisée, dirigée et de délétion menées dans ce travail ont permis de montrer qu'OpgG interagit avec les autres constituants du complexe enzymatique et participe à la formation des branches.

Mots clés : glucanes périplasmiques osmorégulés, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Escherichia coli*, enzyme de branchement

Title: Osmoregulated Periplasmic Glucans biosynthesis: genes demonstration implied at *Pseudomonas aeruginosa* to proteins structural analysis at *Escherichia coli*

In *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae*, and *Escherichia coli*, the *opgGH* operon encodes two proteins that are necessary to OPG synthesis. We have first demonstrated that in *Pseudomonas aeruginosa* the *opgGH* locus, and not the *ndvB* locus, controls OPG synthesis. Moreover, OPG deficient bacteria form deficient biofilms. *P. aeruginosa* OPGs are made of 5 to 10 glucose units assembled in a linear backbone by β -1,2 linkages, and to which branches are added by β -1,6 linkages. *P. aeruginosa* OPGs are very similar to *E. coli* OPGs. In *E. coli*, OpgH, a type 2 glucosyltransferase located in the inner membrane, catalyzes the backbone synthesis from UDP-glucose. OpgG, a periplasmic protein, would interact with OpgH for backbone synthesis and would participate in branch addition. In *E. coli*, OpgD, the product of an *opgG* paralog, would control the OPG synthesis machinery. *opgG* mutants do not form OPGs while *opgD* mutants form altered molecules. Considering the high level of similarity in the primary sequences of OpgG and OpgD, we undertook the crystallization of both proteins to get a better insight in their respective functions. We obtained OpgD crystals that diffracted to a too low resolution to give an accurate electron density map. From the three-dimensional structure of OpgG (established by Hanouille et al. in 2004) and the various strategies of mutagenesis done in this work (localized, directed, and deletion) we can conclude that OpgG interacts with its partners in an enzymatic complex and is involved in branch formation.

Keywords : Osmoregulated periplasmic glucan, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Escherichia coli*, branching enzyme
