

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Présentée par

Aurélie DELANGLE

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

**Contribution à l'analyse du pouvoir pathogène
d'*Erwinia chrysanthemi***



Soutenue le 11 octobre 2007, devant la commission d'examen composée de :

Président :	Jean-Claude MICHALSKI
Rapporteurs :	Annick JACQ Thierry FONTAINE
Examineur :	Nicole COTTE-PATTAT
Directeur de Thèse :	Jean-Marie LACROIX
Co-Directeur de Thèse :	Jean-Pierre BOHIN

Remerciements

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR8576 CNRS) de l'université des Sciences et Technologies de Lille dans l'équipe de Génétique des Enveloppes Bactériennes sous la direction de Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bohin et de Monsieur Jean-Marie Lacroix.

Je tiens à remercier Madame Annick Jacq et Monsieur Thierry Fontaine d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, Madame Nicole Cotte-Pattat d'examiner ma thèse et Monsieur Jean-Claude Michalski de présider le jury.

Je remercie Jean-Pierre Bohin de m'avoir conseillée sur l'orientation de mes études, de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir partagé ses nombreuses connaissances.

Je remercie tout particulièrement Jean-Marie Lacroix d'avoir encadré l'ensemble de ce travail, de m'avoir conseillée, écoutée mais aussi de m'avoir supportée (comme il me le répète assez souvent !).

Un grand merci à Carmen Ödberg pour son soutien, ses conseils et son amitié. Elle m'a beaucoup aidée à positiver dans les moments difficiles et à me détendre. J'ai beaucoup apprécié de travailler les enseignements avec Virginie Cogez et je la remercie pour les nombreux échanges scientifiques.

Merci aux autres membres de l'équipe et tout particulièrement, merci à Gilles Boussemart et Anne-France Prouvost pour leur bonne humeur et leurs nombreuses blagues. Merci à Luciane Prioli-Ciapina et à Jacqueline Dondeyne pour leur sympathie.

Je remercie également l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail : Anne-Sophie Vercouter, Marie-Christine Slomianny, Bernadette Codeville, Adeline Page, Isabelle Landrieu, Jérôme Lemoine et Nicole Cotte-Pattat.

Un grand merci à Brigitte Delrue pour ses nombreux conseils, son aide et son soutien pour mon projet professionnel. Et merci aux membres de l'ABG ayant participé aux différentes formations sur l'insertion professionnelle des jeunes docteurs.

Enfin je remercie beaucoup mes parents pour leur confiance dans le choix de mes études et de m'avoir soutenue comme l'ont fait également l'ensemble des membres de ma famille et mes amis.

Sommaire

Sommaire

Introduction	1
I. La virulence d'<i>E. chrysanthemi</i>	1
A. Les hôtes	1
B. La paroi des cellules végétales	2
1. La structure	2
2. La composition	3
a. La cellulose.....	3
b. L'hémicellulose	3
c. La pectine	4
C. Le développement de la maladie	5
1. La pectinolyse	5
2. La régulation de la pectinolyse	6
3. La cellulolyse.....	10
4. La protéolyse	10
5. D'autres enzymes	10
6. D'autres intervenants dans le pouvoir pathogène.....	10
II. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)	11
A. L'enveloppe des Protéobactéries.....	11
1. La membrane interne	12
a. Les lipides.....	12
b. Les protéines	13
2. La membrane externe	13
a. Les lipides.....	13
b. Les protéines	14
3. Le périplasme	15
a. Le peptidoglycane	15
b. Les protéines	15
c. Les glucanes périplasmiques osmorégulés	16
4. Les structures associées à l'enveloppe	16
a. La capsule	16
b. Les flagelles.....	16
c. Les pili	17
B. La structure des OPG	17
1. La famille I	17
2. La famille II	18
3. La famille III.....	18
4. La famille IV	18
C. La biosynthèse des OPG chez <i>E. chrysanthemi</i> et la régulation	19
D. Le rôle des OPG	21
III. Les systèmes à deux composants et le système Rcs	23
A. Les systèmes à deux composants	23
B. Le système RcsCDB et RcsF.....	26
C. D'autres systèmes à 2 composants chez les <i>Erwiniae</i>	30

IV. La réponse au stress de l'enveloppe.....	31
A. La voie σ^E	31
B. Les systèmes à deux composants.....	32
IV. Les objectifs du travail.....	35
Matériels et méthodes	36
I. Souches, milieux et conditions de croissance.....	36
A. Les souches bactériennes utilisées.....	36
B. Les plasmides utilisés.....	36
C. Les milieux de culture et conditions de croissance des bactéries.....	36
II. Techniques de protéomique.....	40
A. Extraction des protéines membranaires et solubles.....	40
B. Extraction des protéines périplasmiques.....	41
C. Dosage des protéines.....	41
D. Electrophorèse monodimensionnelle.....	41
E. Electrophorèse bidimensionnelle.....	41
F. Coloration des gels.....	42
G. Analyse informatique des gels.....	42
H. Identification des protéines.....	42
III. Techniques de biochimie.....	43
A. Purification de GanA.....	43
B. Détermination des activités enzymatiques.....	43
1. Les activités β -galactosidase et β -glucuronidase.....	43
2. L'activité 1,4- β -endogalactanase.....	43
C. Détermination du pH optimum et de la température optimale de GanA.....	44
D. Dosage des extrémités réductrices.....	44
E. Dosage des glucides.....	44
IV. Techniques de génétique.....	45
A. Construction des mutations dans le génome d' <i>E. chrysanthemi</i>	45
B. Préparation des cellules compétentes.....	45
C. La transformation.....	45
D. Insertion d'un transposon dans le génome.....	45
V. Techniques de biologie moléculaire.....	46
A. Extraction et purification d'ADN.....	46
B. Enzymes de restriction et de modification.....	46
C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	46
D. Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse.....	48
E. Séquençage.....	48
F. Clonage de la boucle périplasmique de RcsC et RcsD pour une expression cytoplasmique.....	48
1. Clonages dans pET-29a.....	48
2. Clonages dans pGEX-6P.....	48
G. Clonage de RcsF pour une expression périplasmique.....	49

H. Clonage de la boucle périplasmique de RcsC et RcsD pour une expression périplasmique	49
I. Expression des protéines recombinantes	49
J. Clonage pour l'expression périplasmique des boucles périplasmiques de RcsC ou de RcsD avec RcsF	50
K. Insertion de <i>rscF</i> en monocopie sur le génome d' <i>E. coli</i>	50
Résultats	52
I. Analyse protéomique comparative de la souche sauvage d'<i>E. chrysanthemi</i> avec différents mutants	52
A. Analyse protéomique du mutant <i>opgG</i>	52
1. Croissance du mutant <i>opgG</i>	52
2. Analyse des protéines membranaires	53
3. Analyse des protéines solubles	56
a. L'enveloppe.....	62
b. Le métabolisme	64
c. La mise en conformation et la dégradation des protéines	66
d. Les autres fonctions.....	67
1. La croissance du mutant <i>rscC2</i>	68
2. Analyse des protéines solubles	68
a. L'enveloppe.....	69
b. Le métabolisme	69
c. La mise en conformation et la dégradation des protéines	70
d. Les autres fonctions.....	71
II. Caractérisation d'un locus impliqué dans le catabolisme des galactanes chez <i>E. chrysanthemi</i>	77
A. Identification du locus <i>gan</i>	77
B. Caractérisation de l'enzyme GanA.....	79
1. Structure 3D de GanA	79
2. Localisation de GanA	82
3. Purification de GanA et détermination de ses propriétés	82
4. Activité de GanA	84
C. Caractérisation de l'enzyme GanB.....	87
D. Caractérisation du système de transport des galactanes.....	89
E. Régulation des gènes <i>gan</i>	90
1. La source de carbone	90
2. La phase de croissance	90
3. Régulation par GanR	92
F. Implication du locus <i>gan</i> dans l'infection	93
1. L'expression durant l'infection	93
2. La virulence	94
III. Etude des relations entre RcsC, RcsD, RcsF et les OPG	95
A. Expression des boucles périplasmiques de RcsC et RcsD.....	95
B. L'expression périplasmique de RcsF	100
C. Expression périplasmique de la boucle périplasmique de RcsC et de RcsD.....	102
D. Expression périplasmique de la boucle périplasmique de RcsC ou RcsD avec RcsF ...	103

Discussion	105
I. Les OPG.....	105
A. Perturbation du protéome en absence d'OPG : la réponse à un stress	105
B. Impact de la mutation <i>rcsC2</i> sur le protéome	106
C. Perspectives	106
II. Les galactanes	108
A. Dégradation des constituants de la pectine : utilisation des galactanes par <i>E. chrysanthemi</i>	108
B. Perspectives	112
Références	114
Annexes	131
Publications	135

Introduction

Introduction

Les bactéries du genre *Erwinia* sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatives, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces Protéobactéries sont associées aux végétaux en tant que saprophytes, épiphytes ou pathogènes. *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* et *Erwinia carotovora ssp. carotovora* sont des bactéries phytopathogènes responsables de pourriture molle. Ces bactéries présentent un impact écologique et économique important car elles infectent de nombreuses plantes réparties partout dans le monde. Bien que le genre *Erwinia* est souvent utilisé pour décrire ce groupe (Dye, 1968 and 1969), elles ont été classées dans un autre genre, *Pectobacterium* (Hauben et coll., 1998). Plus récemment encore, *Pectobacterium chrysanthemi* a été transférée dans le nouveau genre *Dickeya* (Samson et coll., 2005) et son nom actuel est *Dickeya dadantii*.

I. La virulence d'*E. chrysanthemi*

A. Les hôtes

Ces trois *Erwinia* sont des pathogènes de nombreuses espèces de plantes, cultivées ou non, des régions tempérées aux régions tropicales (Pérombelon et Kelman, 1980). *E. chrysanthemi* est retrouvée principalement dans les climats subtropicaux et tropicaux et possède un large spectre d'hôtes incluant notamment la pomme de terre et le *Saintpaulia ionantha* (Figure 1b). Dans des régions tempérées, elle provoque surtout des maladies sur la pomme de terre et l'endive. Récemment, il a été montré qu'*E. chrysanthemi* est capable d'infecter des insectes (Grenier et coll., 2006). *E. carotovora ssp. carotovora* touche de nombreuses plantes dans les régions subtropicales et tempérées et a probablement un spectre d'hôtes plus large qu'*E. chrysanthemi*. Au contraire, *E. carotovora ssp. atroseptica* a un spectre d'hôte limité avec la pomme de terre comme seul hôte dans les régions tempérées (Figure 1a). La pathogénie de ces *Erwinia* est principalement due à leur capacité à dégrader la paroi des cellules végétales.

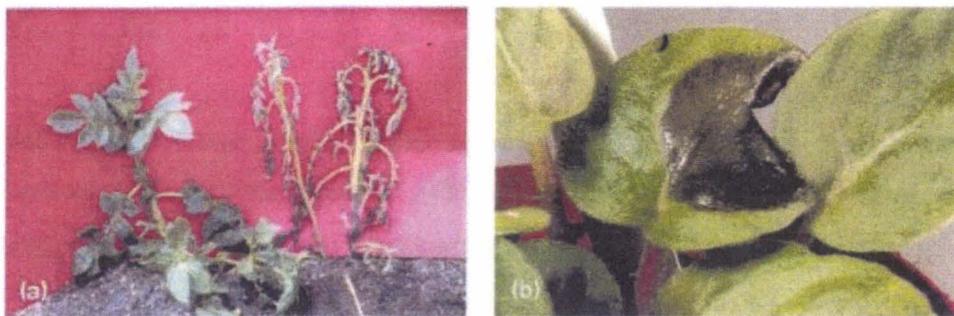


Figure 1 : (a) Comparaison d'une plante de pomme de terre saine (gauche) et d'une plante infectée par *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (droite). (b) Infection d'une feuille de *Saintpaulia ionantha* par *Erwinia chrysanthemi* (Toth et coll., 2003).

B. La paroi des cellules végétales

La paroi est un élément fondamental permettant la structuration et la rigidité du tissu végétal.

1. La structure

La paroi des cellules végétales matures est composée de 3 parties (Figure 2) :

- la paroi primaire, composée de fibres de cellulose assemblées dans une matrice de pectine.
- La paroi secondaire est constituée de cellulose et d'hémicellulose. Cette paroi peut être renforcée par de la lignine. La paroi secondaire s'intercale entre la membrane plasmique et la paroi primaire.
- La lamelle moyenne, constituée de pectine, est la partie la plus externe de la paroi. Elle est commune à deux cellules voisines. Elle est un élément important puisqu'elle assure la cohésion des tissus.

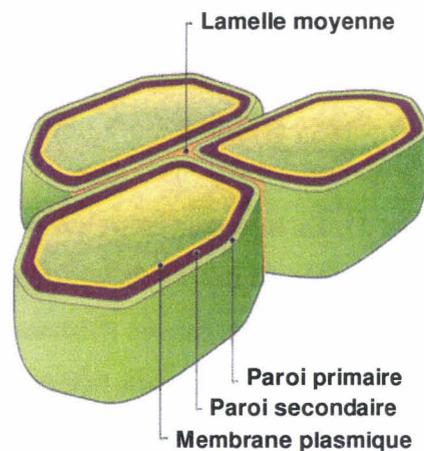


Figure 2 : Structure de la paroi des cellules végétales.

2. La composition

Les parois végétales sont constituées à 90 % de polysaccharides qui sont répartis en 3 groupes : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine.

a. La cellulose

La cellulose représente le polysaccharide majeur de la paroi végétale. C'est un polymère linéaire de résidus de glucose liés en β -1,4. Sa principale fonction est d'assurer la rigidité de la paroi des cellules végétales.

b. L'hémicellulose

L'hémicellulose est un polysaccharide très hétérogène. Elle est composée en majorité de xyloglucanes et de xylanes. Les xyloglucanes sont constitués d'un squelette linéaire de cellulose ramifié principalement par des résidus de xylose mais aussi par des résidus de galactose et de fucose. Les xylanes sont constitués de résidus de xylose liés en β -1,4 et ramifiés principalement par de l'arabinose. La proportion des ces 2 constituants varie fortement suivant la plante (Muyerowitz et Somerville, 1994).

c. La pectine

La pectine est un hétéropolysaccharide de structure complexe, appelé aussi acide polygalacturonique (PGA) méthylestérifié et/ou acétylestérifié. Elle est constituée d'homogalacturonate (HGA), de rhamnogalacturonate de type I (RGI) et de rhamnogalacturonate de type II (RGII) (Figure 3). La molécule HGA est une chaîne linéaire d'acide galacturonique (GalA) liés en α -1,4. La molécule RGII a un squelette HGA avec des chaînes latérales constituées de divers sucres (galacturonate, fucose, rhamnose, arabinose, ...) reliés entre eux par des liaisons variées. La molécule RGI est un hétéropolymère branché alternant des résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4 et de rhamnose liés en α -1,2 sur lesquels sont branchées principalement des chaînes latérales neutres d' α -1,5-arabinane ou de galactane (Willats et coll., 2001). Deux types de chaînes latérales de galactane peuvent être définies. Les galactanes de type I sont constitués de résidus de D-galactopyranose liés en β -1,4. Ces β -1,4-galactanes sont les chaînes latérales neutres des RGI les plus abondantes et peuvent représenter jusqu'à 20 % des oligosaccharides pectiques chez certaines plantes telles que la pomme de terre ou le Ginseng (Zhu et coll., 2005). Les galactanes de type II sont constitués d'un squelette de D-galactopyranose liés en β -1,3 et qui peuvent être branchés par des résidus de galactopyranose en β -1,6. La structure de ces chaînes, variable selon l'espèce, influence les propriétés physicochimiques de la pectine (Hwang et coll., 1993).

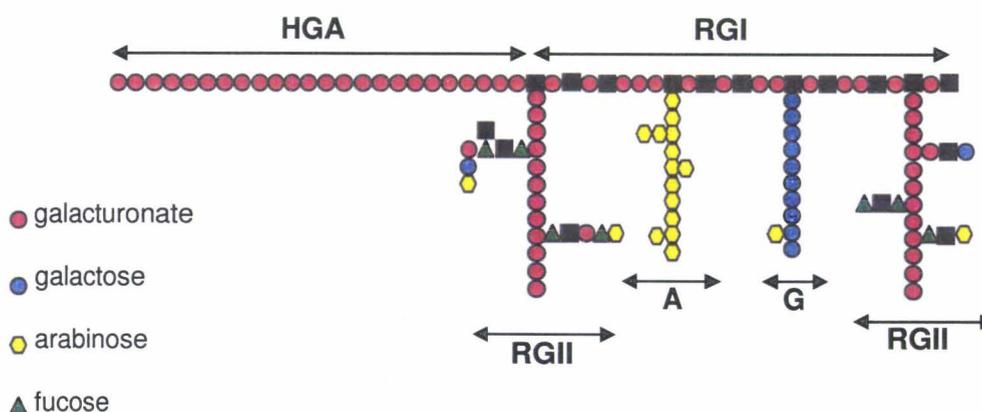


Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la pectine. HGA, homogalacturonate ; RGI, rhamnogalacturonate de type I ; RGII, rhamnogalacturonate de type II ; A, arabinane ; G, galactane (d'après Vincken et coll., 2003).

C. Le développement de la maladie

E. chrysanthemi est trouvée à la surface des plantes et dans le sol. Elle pénètre dans la plante par des blessures ou par des entrées naturelles présentes à la surface de celle-ci. A l'intérieur de la plante, *E. chrysanthemi* est retrouvée dans le tissu vasculaire et dans les espaces intercellulaires. Les symptômes de la maladie se manifestent par la nécrose des tissus végétaux appelée macération ou pourriture molle. Elle est produite par la désorganisation des tissus végétaux et la lyse des cellules provoquées par la dégradation de la paroi de ces cellules. Cette dégradation est assurée par la sécrétion de cellulases, de protéases mais surtout de pectinases.

1. La pectinolyse

E. chrysanthemi produit de nombreuses pectinases aux activités différentes en relation avec la structure complexe de la pectine. Ces enzymes ont un rôle prédominant dans la macération des tissus végétaux (Collmer et Keen, 1986). Elle sécrète des endo-pectinases, qui clivent le polymère au hasard et des exo-pectinases, qui clivent le polymère à partir de l'extrémité réductrice pour libérer des dimères. *E. chrysanthemi* possède 5 types de pectinases : au moins 6 endo-pectate-lyases (PelA à PelE et PelL), une exo-pectate-lyase (PelX), 2 pectine-méthylestérases (PemA et PemB), 2 pectine-acétylestérases (PaeY et PaeX), une pectine-lyase (PnlA) et 3 exo-polygalacturonases (PehV, PehW et PehX) (Hugouvieux et coll., 1996 ; Shevchik et Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997). Elle sécrète également une rhamnogalacturonate-lyase (RhiE), capable de cliver les chaînes de rhamnogalacturonate (Laatu et Condemine, 2003). Ces enzymes sont sécrétées par un système de type II dans le milieu extracellulaire.

La sécrétion par le système de type II s'effectue en 2 étapes : la première étape consiste en la sécrétion des protéines à travers la membrane cytoplasmique. Cette étape s'effectue soit par la voie de sécrétion générale (Système Sec) soit par le système TAT (« Twin Arginine Translocation »). Dans le périplasme, la protéine conformée est prise en charge par un système, appelé Out, composé de plusieurs protéines (une quinzaine) traversant la totalité de l'enveloppe formant un canal permettant aux protéines de traverser la membrane externe (Russel, 1998). Chez *E. chrysanthemi*, la sécrétion des pectinases et des cellulases se fait grâce à la machinerie Sec.

Les produits de dégradation de la pectine, issus de l'action des pectinases sécrétées, vont servir de source de carbone et d'énergie pour sa croissance (Figure 4). La dégradation de la pectine par les enzymes extracellulaires produit principalement des dimères, trimères et tétramères avec une petite quantité d'oligomères plus longs. Ces oligomères GA_n traversent la membrane externe grâce à la porine KdgM (Blot et coll., 2002). Ils sont alors dégradés en dimères par les pectinases périplasmiques (PehX, PehV, PehW et PehX) ou membranaires (PemB). Ces dimères traversent la membrane interne grâce aux systèmes de transport, TogT et TogMNAB (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Reverchon, 2001). Dans le cytoplasme, ces dimères sont clivés par une oligogalacturonate-lyase (Ogl) cytoplasmique et peuvent suivre 2 voies pour aboutir à un seul intermédiaire commun, le KDG (2-céto-3-déoxygluconate). Le KDG rejoint le métabolisme intermédiaire classique en étant clivé en pyruvate et 3-phosphoglyceraldéhyde. Deux systèmes de transport permettant l'entrée de ces monomères ont été caractérisés : ExuT pour le transport du galacturonate et KdgT pour le transport du KDG (San Francisco et Keenan, 1993; Condemine et Robert-Baudouy, 1987). Ces monomères suivent ensuite les mêmes voies de dégradation. Mais pendant le catabolisme de la pectine, ces monomères sont essentiellement formés intracellulairement.

2. La régulation de la pectinolyse

La présence de pectine ou de ses dérivés est le principal signal requis pour l'induction des activités pectinolytiques. Mais ces activités sont également modulées par la présence d'extraits de plante, la phase de stationnaire de croissance, l'osmolarité, les faibles températures (25°C), les conditions d'anaérobiose et de manque d'azote, la faible concentration en fer, la présence d'agents endommageant l'ADN. Les stimuli sont perçus par de nombreux régulateurs contrôlant l'expression des gènes de la pectinolyse (Figure 5).

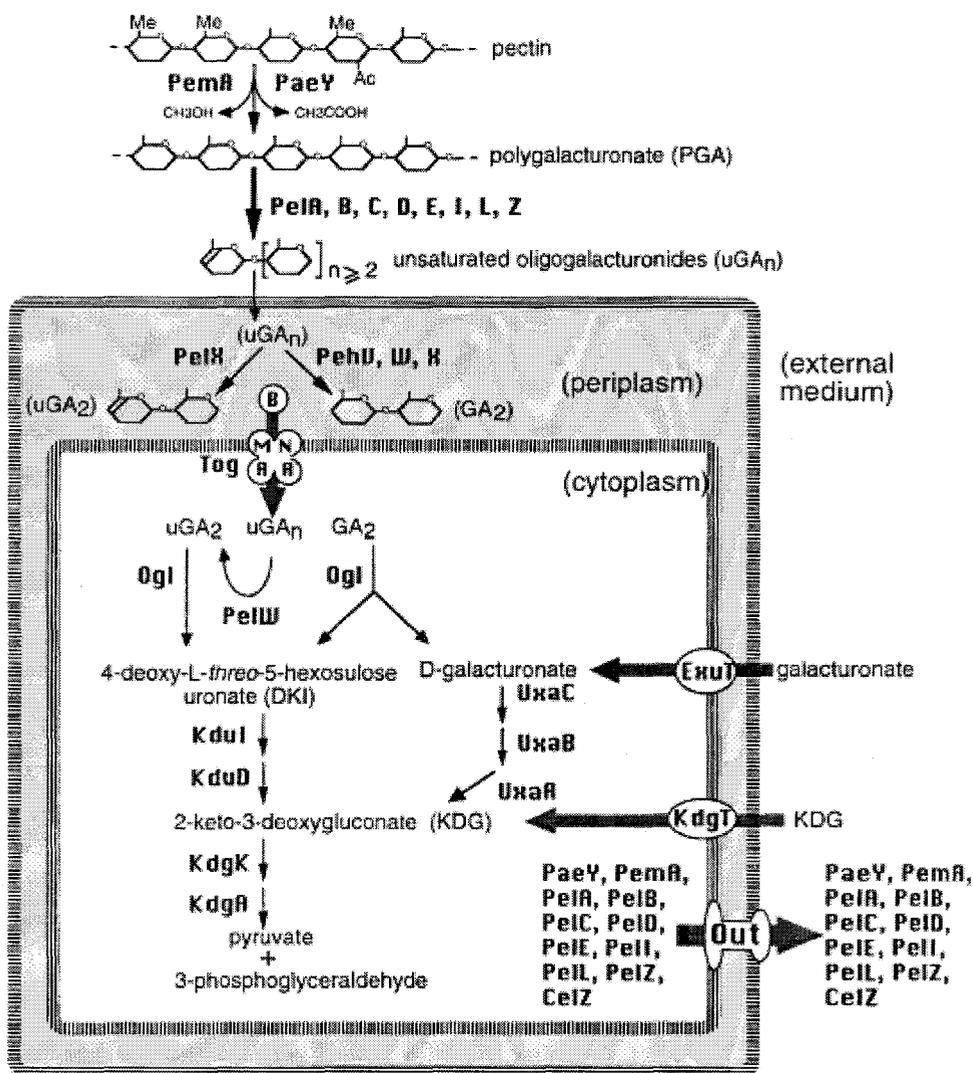


Figure 4 : Dégradation et catabolisme de la pectine chez *E. chrysanthemi*, d'après Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 2001.

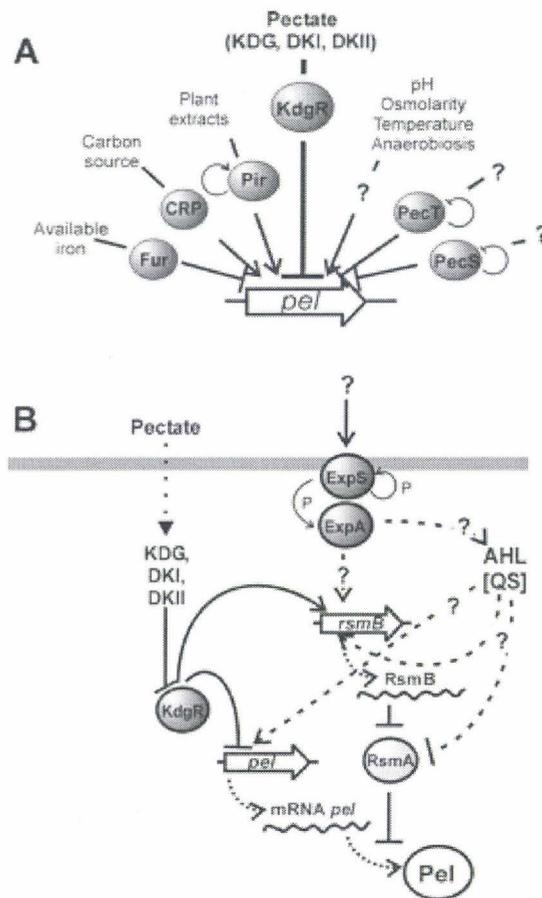


Figure 5 : Régulation de la production des exoenzymes pectinolytiques chez les *Erwinia*, d'après Brencic et Winans, 2005. A. Signaux et protéines régulatrices des gènes *pel* chez *E. chrysanthemi*. B. Interaction entre le répresseur KdgR et le système global de régulation ExpS-ExpA dans la régulation de la production des exoenzymes chez *E. carotovora*.

KdgR est un répresseur global des gènes impliqués dans le catabolisme de la pectine et des gènes du système de sécrétion Out (Reverchon et coll., 1991). La répression de KdgR est levée en présence de pectine ou de ses dérivés, tels que le polygalacturonate (PGA) et le galacturonate (GA) (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992). En fait, le KDG est la principale molécule qui interagit avec KdgR provoquant la dissociation de KdgR de ses opérateurs. Mais le DKI (5-céto-4-déoxyuronate) et le DKII (2,5-dicéto-3-déoxygluconate) peuvent également interagir avec KdgR (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). Cette protéine chez *E. carotovora* semble agir de façon similaire (Matsumoto et coll., 2003). De plus, chez *E. carotovora*, un homologue de KdgR, RexZ, a été caractérisé. Comme KdgR, RexZ est un répresseur de la production des exoenzymes (Thomson et coll., 1999). Un orthologue de RexZ

a été identifié chez *E. chrysanthemi*.

PecT réprime la synthèse de certains gènes codant des pectate-lyases tels que *pelC*, *pelD*, *pelE* et *pelL* (Castillo et Reverchon, 1997). PecT appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR et serait également impliqué dans la régulation de la biosynthèse des exopolysaccharides et de la motilité. *E. carotovora* possède un orthologue de PecT appelé HexA (Harris et coll., 1998).

D'autres systèmes, connus comme affectant de nombreuses fonctions, interviennent également dans la régulation de la pectinolyse. Parmi ceux-ci, on trouve un système capteur de quorum. Cette régulation dépend des gènes *expI/expR* chez *E. chrysanthemi* et *carI/carR* chez *E. carotovora*. Lorsque la densité cellulaire augmente, la quantité d'OHHL (N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone), produite par les gènes *expI* et *carI*, atteint un niveau critique suffisant pour activer le gène *expR* et *carR* (Nasser et coll., 1998; McGowan et coll., 1995). Ces activateurs transcriptionnels vont alors induire la production d'exoenzymes.

Plusieurs systèmes à 2 composants affectent l'expression des gènes de la pectinolyse. Les systèmes à 2 composants sont constitués d'un capteur généralement transmembranaire qui, à la suite de la perception d'un stimulus, modifie le taux de phosphorylation d'un régulateur cytoplasmique qui module alors l'expression de gènes cibles. Chez *E. chrysanthemi*, le système à 2 composants composé du capteur membranaire PecM et du régulateur PecS (Praillet et coll., 1997) participe au contrôle des gènes nécessaires pour le catabolisme de la pectine (*pel*, *cel* et *out*) et des gènes impliqués dans la production d'un pigment bleu, l'indigoïne (*ind*) (Reverchon et coll., 1994). Chez *E. carotovora*, il n'y a pas d'orthologue de PecS (Matsumoto et coll., 2003). Chez *E. carotovora*, on trouve le système à deux composants ExpS-ExpA. Ce système est homologue au système GacS-GacA trouvé chez de nombreuses Protéobactéries et fortement impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* et *P. syringae*, bactérie phytopathogène (Goodman et coll., 2004 ; Kitten et coll., 1998). Ce système contrôle positivement RsmB, un petit ARN qui séquestre le répresseur traductionnel RsmA et ainsi permet la traduction des exoenzymes pectinolytiques (Cui et coll., 2001). Chez *E. chrysanthemi*, on trouve une protéine annotée comme BarA, orthologue au capteur GacS et une protéine annotée comme UvrY, orthologue au régulateur GacA. Contrairement aux systèmes 2 composants évoqués dans ce chapitre, les gènes codant ces protéines ne sont pas organisés en opéron.

Enfin, aussi bien chez *E. chrysanthemi* que chez *E. carotovora*, la production des pectate-lyases est soumise à la répression catabolique, avec l'implication de la protéine CRP (« cAMP response protein ») (Tsuyumu, 1979; Collmer and Bateman, 1981). Cette répression est observée lors de la croissance en présence de glucose mais aussi en présence des produits de dégradation de la pectine. En présence de ces deux substrats, le taux d'AMPc diminue, CRP ne peut plus se fixer à l'ADN pour activer certains gènes. Un mutant *crp* d'*E. chrysanthemi* montre une forte diminution de la virulence sur tubercules de pomme de terre, sur feuilles d'endive et sur les *Saintpaulia* (Reverchon et coll., 1997).

3. La cellulolyse

E. chrysanthemi produit deux cellulases codées par les gènes *celZ* et *celY*. CelZ est une enzyme extracellulaire sécrétée par le système Out et représente l'activité majeure, tandis que CelY est une enzyme périplasmique. Ces deux endo- β -1,4-glucanases ne semblent pas essentielles pour la pathogénie (Boccard et coll., 1994). Elles agissent en synergie avec d'autres enzymes de différentes classes pour attaquer les plantes. L'expression de CelZ est induite en phase stationnaire (Aymeric et coll., 1988).

4. La protéolyse

E. chrysanthemi produit des exoprotéases qui ne sont pas indispensables à la virulence. Les protéases sont sécrétées par le système de type I, Ptr. Ce système est composé de 3 protéines, PtrD, PtrE et PtrF, traversant toute l'enveloppe et permettant la translocation des protéines du cytoplasme au milieu extérieur en une étape (Delepelaire et Wandersman, 1991).

5. D'autres enzymes

E. chrysanthemi produit d'autres enzymes de dégradation extracellulaires : une nucléase (Moulard et coll., 1993), une phospholipase (Keen et coll., 1992) et une xylanase (Keen et coll., 1996). Ces enzymes, comme les cellulases et les protéases, ne semblent pas indispensables au pouvoir pathogène contrairement aux pectinases.

6. D'autres intervenants dans le pouvoir pathogène

Le système de sécrétion de type III (TTSS) est un système retrouvé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif pathogènes pour les animaux ou les plantes. Ce système est nécessaire pour infecter les plantes hôtes et provoquer la réponse hypersensible dans les

plantes non hôtes. Ce système injecte directement les protéines effectrices dans les cellules hôtes. Ces protéines perturbent le métabolisme cellulaire et interfèrent avec les mécanismes de défense de la plante hôte. Chez les bactéries phytopathogènes, le TTSS fait parti des gènes *hrp* (« hypersensitive response and pathogenicity ») et *hrc* (« hypersensitive response and pathogenicity genes conserved »). Il assiste à la virulence bactérienne d'*E. chrysanthemi* (Yang et coll., 2002) et d'*E. carotovora* (Rantakari et coll., 2001). La surproduction ou l'absence des gènes *hrp* diminue la virulence.

La fixation du fer est un autre processus crucial pour la pathogenèse. *E. chrysanthemi* produit deux sidérophores, la chrysobactine et l'achromobactine, pour fixer le fer dans un environnement pauvre en fer comme la plante (Mahé et coll., 1995). Cette faible quantité de fer est un des signaux qui entraîne la transcription des gènes codant des pectate-lyases ainsi que les gènes impliqués dans la transport du fer. Cette métallorégulation est médiée par le répresseur Fur (Franza et coll., 1999). Des mutants dans l'assimilation du fer présentent une croissance restreinte dans la plante durant les premières phases de l'infection.

Les glucanes périplasmiques osmorégulés ou OPG sont également indispensables pour la pathogenèse d'*E. chrysanthemi* car des mutants *opg* présentent une perte totale de virulence chez *E. chrysanthemi* (Page et coll., 2001).

II. Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG)

Les OPG (« Osmoregulated Periplasmic Glucans ») sont un des constituants essentiels de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (Bohin, 2000).

A. L'enveloppe des Protéobactéries

L'enveloppe des Protéobactéries est composée de deux membranes, la membrane interne et la membrane externe, délimitant un compartiment aqueux appelé le périplasme. C'est au niveau de cette enveloppe, lieu d'échanges et de communication de la bactérie avec le milieu extérieur, que s'initient les mécanismes qui permettront l'adaptation de la bactérie à son milieu (Figure 6).

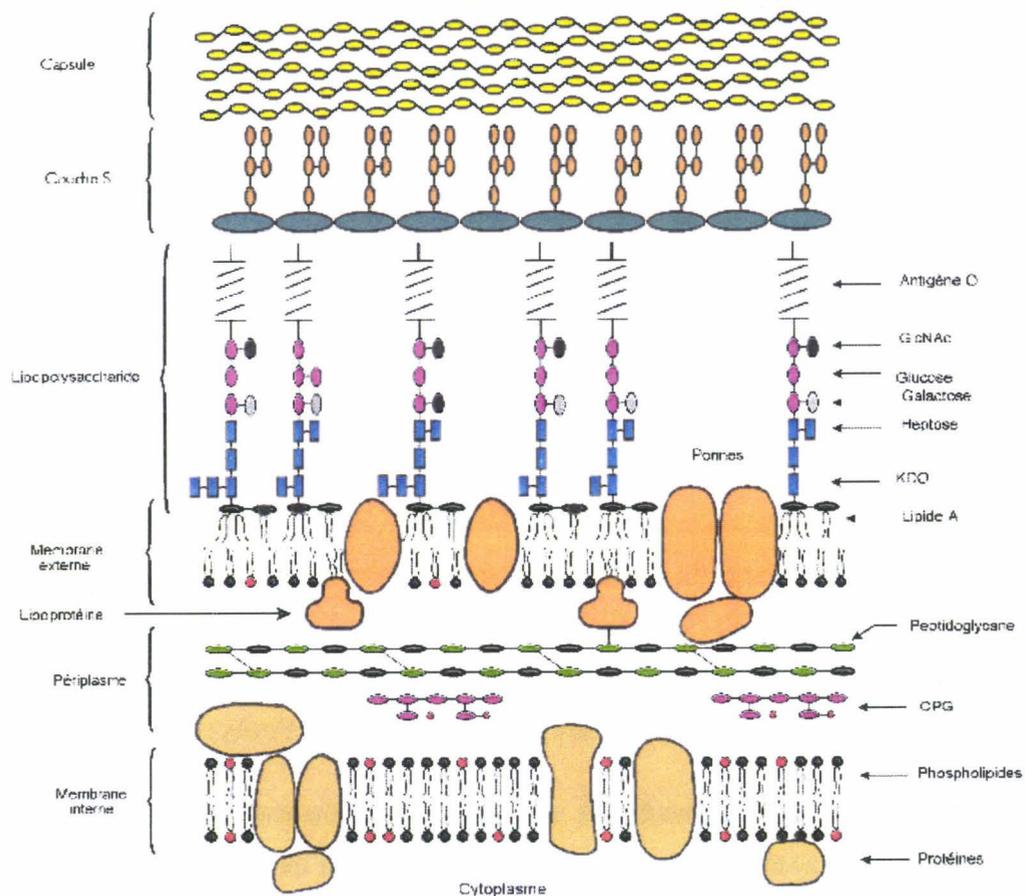


Figure 6 : Schéma de l'enveloppe chez les Protéobactéries, d'après Raetz (1986).

1. La membrane interne

La membrane interne ou la membrane cytoplasmique est une membrane classique qui entoure le cytoplasme des cellules. Elle contient des protéines et des lipides en proportions variables.

a. Les lipides

Les seuls lipides présents dans la membrane cytoplasmique sont des phospholipides. 3 espèces sont principalement présentes : la phosphatidyléthanolamine (environ 75 %), le phosphatidylglycérol (environ 20 %) et le cardiolipide (environ 5 %) (Vanden Boom et Cronan, 1989). Leur proportion varie selon la souche et les conditions de croissance. Ils sont constitués de glycérol-3-phosphate estérifié par 2 acides gras. La longueur et la saturation de

ces acides gras varient selon les conditions environnementales telles que la température, la phase de croissance, la composition du milieu de croissance ou encore celles provoquant une perturbation de la membrane.

b. Les protéines

On estime qu'il y a environ 120 espèces protéiques au niveau de la membrane cytoplasmique à un instant donné (Sato et coll., 1977). Les espèces protéiques varient considérablement suivant les conditions environnementales afin de s'adapter à ces changements.

Les protéines membranaires participent à un grand nombre de fonctions distinctes incluant la production d'énergie, le transport de diverses molécules, la translocation de macromolécules et la transduction de signaux environnementaux nécessaires à l'adaptation aux changements. Ces protéines interviennent également dans d'autres fonctions comme la motilité, la ségrégation et la réplication du chromosome et dans de nombreuses synthèses : le peptidoglycane, les phospholipides, le LPS, les exopolysaccharides (EPS), les OPG...

2. La membrane externe

La membrane externe n'est présente que chez les bactéries à Gram négatif. Elle permet de protéger les cellules contre certaines agressions du milieu extérieur en empêchant ou en ralentissant l'entrée de composés délétères (les antibiotiques, les détergents, les molécules produites par la cellule hôte infectée). Des petits composés hydrophiles ou des molécules spécifiques peuvent passer à travers cette membrane grâce à des protéines de transport spécifiques ou non. Cette membrane forme également une double couche lipidique dont les deux feuilletts sont très différents l'un de l'autre. La membrane externe contient deux types de lipides et une série de protéines caractéristiques.

a. Les lipides

La bicouche lipidique formée par la membrane externe est composée d'un feuillet interne qui renferme des phospholipides similaires à ceux de la membrane cytoplasmique et d'un feuillet externe composé de lipopolysaccharides (LPS) (Figure 6). Le LPS est un composant spécifique de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Cette grande molécule complexe est constituée d'une partie lipidique et d'une partie glucidique. Elle est composée de 3 parties distinctes (Raetz, 1986). Le lipide A est la région insérée dans la membrane contenant 2 résidus de glucosamine phosphate substitués par des résidus d'acide gras saturé.

Le noyau ou le « core » est la région centrale oligosaccharidique composée par 2 sucres spécifiques, le KDO (acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique) et un heptose (le L-glycéro-D-manno-heptose), ainsi que d'autres sucres (le glucose, le galactose et le N-acétyl-D-glucosamine). Enfin, l'antigène O, lorsqu'il est présent, est composé d'unités répétées de 3 à 5 glucides.

Le LPS joue un rôle dans l'intégrité structurale de l'enveloppe et un rôle dans les relations hôte-bactérie. Ainsi la membrane externe sert de barrière de protection. Elle empêche ou diminue l'entrée des sels biliaires, des antibiotiques ou d'autres substances toxiques qui pourraient tuer ou endommager la bactérie. Pourtant, la membrane externe est plus perméable que la membrane cytoplasmique grâce à la présence de protéines spéciales.

b. Les protéines

Les protéines de la membrane externe ou OMP (« outer membrane proteins ») se divisent en plusieurs catégories : les porines sont les protéines majoritaires mais néanmoins fortement régulées. Elles forment des pores ou des canaux non spécifiques, permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles (< 600 Da) à travers la membrane externe. Les principales sont les protéines codées par les gènes *ompF*, *ompC* et *phoE* qui sont organisées en homotrimères. Les porines OmpF et OmpC sont toujours produites mais leur abondance est fortement régulée par les signaux environnementaux tels que l'osmolarité, la température, la présence de détergents, le taux d'oxygène,... Cette régulation dépend principalement d'un système à deux composants composé de OmpR et EnvZ (Hall and Silhavy, 1981). Par contre, la porine PhoE est produite uniquement en conditions de carence en phosphate (Nikaido and Vaara, 1985). La membrane externe possède également des récepteurs spécifiques pour les molécules trop grosses, des enzymes,... La protéine OmpA est une protéine monomérique très abondante à fonction structurale. Cette protéine possède un domaine N-terminal, ancré dans la membrane externe, et un domaine C-terminal, localisé dans l'espace périplasmique. Ce dernier domaine pourrait interagir avec le peptidoglycane (De Mot and Vanderleyden, 1994). La protéine OmpA joue un rôle dans l'intégrité de la membrane externe. La lipoprotéine de Braun a également une fonction structurale. Les lipoprotéines sont de petites molécules dont le résidu cystéine en N-terminal est substitué par des acides gras. Cette partie lipidique permet l'ancrage de ces protéines soit dans le feuillet interne de la membrane externe ou, plus rarement, dans le feuillet externe de la membrane interne. La partie protéique, hydrophile, est localisée dans le périplasme comme la lipoprotéine de Braun. Environ un tiers de ces

lipoprotéines est lié de manière covalente, grâce à leur résidu lysine situé en C-terminal, au peptidoglycane. Les Entérobactéries possèdent de nombreuses lipoprotéines dans leur enveloppe. On en retrouve environ 90 chez *E. coli*. La majorité sont ancrées dans la membrane externe (Narita et Tokuda, 2006). Les fonctions de ces lipoprotéines semblent très variées. En effet, RcsF est impliquée dans la perception de signaux environnementaux au niveau de l'enveloppe et NlpB participe à l'insertion des OMP dans la membrane.

3. Le périplasma

Le périplasma, ou l'espace périplasmique, est un compartiment qui représente approximativement 20 à 40 % du volume cellulaire (Cayley et coll., 2000). Il est situé entre les deux membranes (Figure 6). Il formerait une sorte de gel visqueux (Hobot et coll., 1984). Il contient la couche de peptidoglycane, des protéines et les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG).

a. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (ou muréine) est un polymère constitué d'un motif disaccharidique répété de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique liés en β -1,4. Ces chaînes glycaniques linéaires sont reliées entre elles de manière covalente par des tétrapeptides. Ces liaisons permettent au peptidoglycane de former un réseau dense autour de la cellule. La membrane externe est reliée de manière covalente au peptidoglycane par l'intermédiaire de la lipoprotéine de Braun. De plus, cette interaction est renforcée par l'association des porines OmpC et OmpF avec le peptidoglycane (DeMartini et Inouye, 1978).

b. Les protéines

Les protéines périplasmiques peuvent être classées selon leur fonction :

- Des protéines affines qui fonctionnent toutes avec des systèmes de transport de type ABC (ATP binding cassette) et en plus pour certaines, avec des récepteurs du chimiotactisme. Ainsi elles interviennent dans la détection ou le transport de sucres, d'acides aminés, de peptides, de vitamines et d'ions.
- Des enzymes cataboliques qui vont dégrader des molécules complexes en précurseurs simples utilisables par la cellule.
- Des enzymes de détoxification qui servent à protéger la cellule.

▪ Des enzymes ou des protéines qui interviennent dans la biogénèse de composés de l'enveloppe : protéines, peptidoglycane, LPS, capsule et OPG. On trouve des protéines ayant un rôle dans la formation de ponts disulfures (DsbA et DsbC), des peptidyl-prolyl-isoméras (SurA et FkpA), des protéines chaperons (Skp et la protéase DegP). Ces protéines interviennent dans la mise en conformation et la dégradation des protéines de l'enveloppe et certaines sont nécessaires pour le transport des OMP vers la membrane externe. Toutes ces protéines sont surexprimées en réponse à un stress causé à l'enveloppe (Raivio et Silhavy, 2001).

c. Les glucanes périplasmiques osmorégulés

Ces glucanes sont présents dans le périplasme des Protéobactéries. Leur quantité dépend de l'osmolarité du milieu. Nous décrirons plus précisément ces glucanes dans la suite de cette partie.

4. Les structures associées à l'enveloppe

Les bactéries ont plusieurs types de structures localisées à l'extérieur de l'enveloppe. Elles jouent un rôle dans la protection, l'attachement ou la motilité. Les trois principales structures qui seront décrites sont la capsule, les pili et les flagelles.

a. La capsule

Les bactéries synthétisent des exopolysaccharides qui peuvent rester liés à la surface de la bactérie pour former une capsule, structure non constante (Figure 6). Ces exopolysaccharides représentent des déterminants antigéniques, c'est le cas des antigènes K et de l'antigène M (acide colanique) chez *E. coli*. La capsule est un élément important pour la survie des bactéries suivant l'hôte dans lequel elle se trouve. C'est aussi un facteur de virulence car elle intervient dans l'adhésion et protège la cellule notamment contre la phagocytose (Vimr et coll., 1995). Chez *E. coli* et chez *E. chrysanthemi*, la synthèse des EPS est gouvernée par les gènes *cps* (« capsular polysaccharide synthesis »). Les gènes *cps* sont fortement régulés selon les conditions environnementales telles que la température, l'hôte, l'osmolarité,...

b. Les flagelles

Certaines bactéries sont capables de se déplacer et la majorité d'entre elles le font grâce à des flagelles. Les flagelles sont constitués d'un moteur, d'un crochet et d'un filament. Suivant le sens de rotation du flagelle, la bactérie alterne le processus de nage et celui de culbute. Le

moteur flagellaire répond aux gradients de concentration de composés attractifs ou répulsifs en modifiant la durée de rotation dans un ou l'autre sens. C'est ce qu'on appelle le chimiotactisme : les chimiorécepteurs, protéines membranaires, perçoivent les substances directement en fonction de leur degré de phosphorylation ou se lient aux protéines affines et transmettent l'information à des protéines qui gouvernent la rotation du flagelle dans un sens ou dans l'autre (Wadhams et Armitage, 2004).

c. Les pili

Les pili sont des organites d'attachement aux surfaces. Ils prennent naissance dans la membrane externe (pili de type I) ou dans la membrane cellulaire (pili de type IV) et s'étendent dans le milieu. Ils sont constitués de protéines structurales nommées pilines. Certains pili, les pili sexuels, jouent un rôle essentiel dans la conjugaison bactérienne. D'autres sont impliqués dans l'attachement des bactéries à diverses surfaces telles que les surfaces abiotiques (verre, plastique) ou surface vivante (tissu des cellules eucaryotes).

B. La structure des OPG

Les OPG sont des polymères de glucose de taille intermédiaire qui sont accumulés dans le périplasme des bactéries confrontées à des milieux de très basse osmolarité. La structure des OPG est variable selon l'espèce et différentes substitutions peuvent être présentes (succinate, acétate, phosphoglycérol,...). Les OPG sont divisés en 4 familles structurales (Bohin et Lacroix, 2006).

1. La famille I

La famille I rassemble les OPG des Entérobactéries (*E. coli* et *E. chrysanthemi*) et des *Pseudomonas* (*P. syringae*). Ces OPG sont constitués de 5 à 12 résidus de glucose. Le squelette consiste en une chaîne linéaire formée par des résidus de glucose liés en β -1,2 avec des branches d'un seul résidu de glucose lié en β -1,6 (Figure 7). Les OPG peuvent être substitués et cette substitution varie suivant l'espèce. Chez *E. coli*, les OPG sont substitués par du phosphoglycérol, de la phosphoéthanolamine et du succinate (Kennedy, 1996), ceux d'*E. chrysanthemi* sont substitués uniquement par du succinate et de l'acétate (Cogez et coll., 2001) alors que ceux de *P. syringae* ne sont pas du tout substitués (Talaga et coll., 1994).

2. La famille II

Les OPG de la famille II sont retrouvés dans la famille des Rhizobiacées (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) et chez *Brucella abortus* (Breedeveld et Miller, 1994). Ce sont des molécules cycliques de 17 à 25 résidus de glucose liés en β -1,2 (Figure 7). Ils peuvent être substitués par du phosphoglycérol, du succinate et du méthylmalonate.

3. La famille III

Les OPG de la famille III sont retrouvés chez les espèces *Bradyrhizobium* appartenant à la famille des Rhizobiacées. Ce sont des molécules cycliques de 10 à 13 résidus de glucose liés en β -1,3 et β -1,6 (Figure 7). Les proportions de liaisons β -1,3 et β -1,6 varient selon les souches.

4. La famille IV

Les OPG de la famille IV sont retrouvés chez *Ralstonia solanacearum* (Talaga et coll., 1996), *Xanthomonas campestris* (York, 1995) et *Rhodobacter sphaeroides* (Talaga et coll., 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 7). Ces OPG peuvent être substitués par des résidus succinate ou phosphoglycérol.

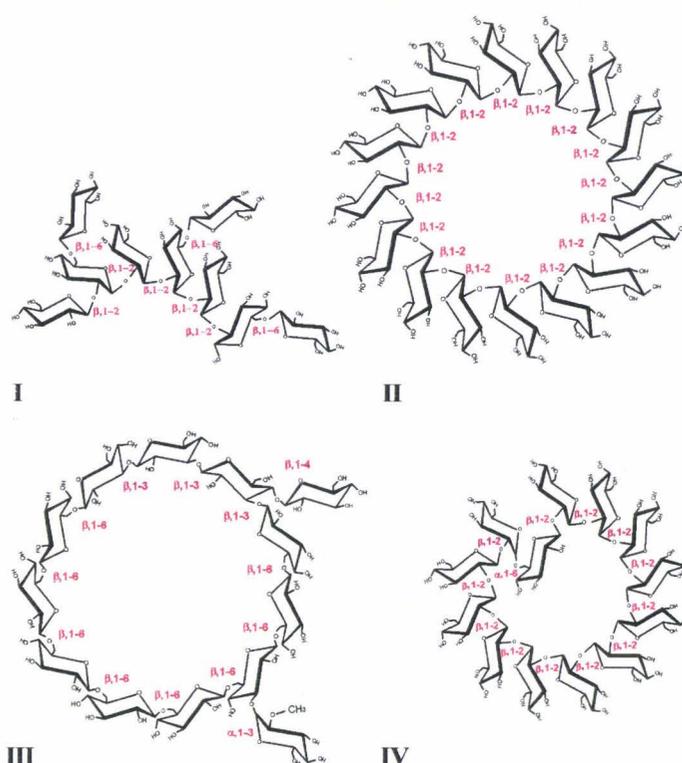


Figure 7 : Représentation des quatre familles d'OPG (de I à IV) (Bohin et Lacroix, 2006).

C. La biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* et la régulation

Selon l'espèce et quelque soit la structure des OPG, la régulation s'effectue au niveau enzymatique, transcriptionnel ou les deux. Cette régulation semble relativement complexe mais conduit toujours à une forte réduction de la quantité d'OPG à haute osmolarité (Bohin et Lacroix, 2006) à l'exception des OPG de *Brucella abortus* dont la quantité semble constante quelque soit l'osmolarité (de Iannino et coll., 2000).

Les OPG d'*E. chrysanthemi* appartiennent à la famille I et le squelette est synthétisé par les produits des gènes *opgG* et *opgH* organisés en opéron. L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines aboutit à une absence de synthèse d'OPG (Page et coll., 2001). Les gènes *opgG* et *opgH* d'*E. chrysanthemi* présentent un fort degré de similitude avec les gènes *opgG* et *opgH* de *P. syringae* et *E. coli* (supérieur à 70 %). Ainsi on peut raisonnablement penser que la synthèse des OPG d'*E. chrysanthemi* est identique à celle d'*E. coli*, organisme où la synthèse est beaucoup mieux étudiée. La protéine OpgH est une protéine de la membrane interne à

activité glucosyltransférase (Weissborn et Kennedy, 1984 ; Debarbieux et coll., 1997). Ainsi le squelette linéaire des OPG est synthétisé et transloqué dans le périplasma pour ensuite être pris en charge par la protéine périplasmique OpgG. Son expression est indispensable à la synthèse des OPG mais sa fonction reste à déterminer. Plusieurs hypothèses sont émises quant au rôle de cette protéine. *In vitro*, OpgH catalyse l'élongation des chaînes linéaires de glucose liés en β -1,2 avec un degré de polymérisation plus long. OpgG formerait des branches par remaniements de ce squelette linéaire. OpgG pourrait également faciliter la translocation du squelette glucosidique et permettre la libération des OPG dans la compartiment périplasmique (Rollet, 2006). Aucun gène catalysant la substitution n'est encore connu chez *E. chrysanthemi*. Par analogie encore, on peut néanmoins suggérer que, comme chez *E. coli*, la protéine catalysant le transfert du succinate, OpgC, est transmembranaire (Figure 8).

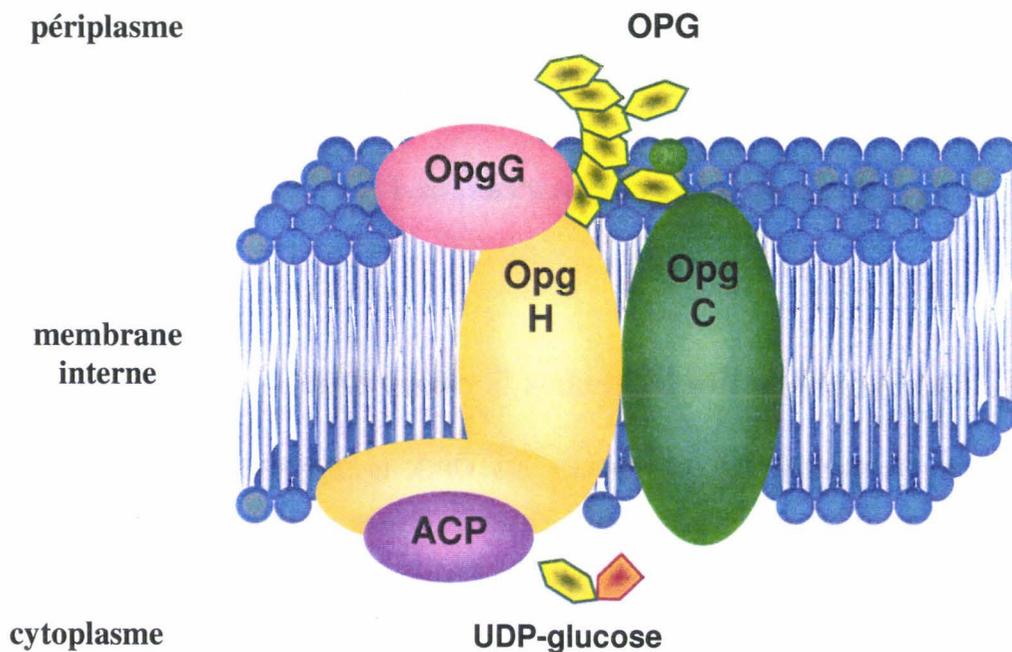


Figure 8 : Modèle de biosynthèse des OPG chez *E. chrysanthemi* d'après Bohin.

D. Le rôle des OPG

Les OPG sont nécessaires à la virulence de bactéries pathogènes pour les plantes et les animaux. En effet, des mutants défectueux dans la synthèse des OPG chez *Agrobacterium tumefaciens* (Puvanesarajah et coll., 1985), chez *Pseudomonas syringae* (Loubens et coll., 1993) et chez *Xanthomonas campestris* (Minsavage et coll., 2004) sont complètement ou sévèrement affectés dans leur virulence vis-à-vis de leurs plantes hôtes. De même, des mutants *opgH* isolés par mutagenèse aléatoire chez *Pseudomonas aeruginosa* PA14 présentent une virulence réduite chez la plante *Arabidopsis thaliana*, chez le ver *Caenorhabditis elegans* et chez la souris (Mahajan-Miklos et coll., 1999). Plus récemment, il a été montré que les OPG sont nécessaires à la survie de *Brucella abortus* dans les macrophages et les cellules épithéliales (Arellano-Reynoso et coll., 2005). Ils sont aussi nécessaires au processus de symbiose des Rhizobiacées avec les plantes. En effet, chez *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum*, l'absence d'OPG provoque un défaut de symbiose (formation de nodules vides de bactéroïdes) chez les plantes hôtes (Geramia et coll., 1987 ; Dunlap et coll., 1996).

Chez *E. chrysanthemi*, les mutants *opg* ont un phénotype pléiotrope (Page et coll., 2001). Ces mutants présentent une motilité réduite probablement due à un défaut de synthèse ou d'assemblage du flagelle. Ce phénotype est également observé chez *E. coli* (Fiedler et Rotering, 1988). Les colonies sont muqueuses traduisant une synthèse accrue des exopolysaccharides. Les mutants présentent une hypersensibilité aux sels biliaires. Ils se caractérisent également par une altération de leur morphologie cellulaire. Les cellules sont plus petites et plus rondes en milieu riche (LB) et filamentent en milieu minimum (63). Ceci semble indiquer un problème général dans la division cellulaire chez ce mutant. La synthèse et la sécrétion des exoenzymes (pectinases, cellulases et protéases) sont diminuées. Enfin, ces mutants montrent une absence totale de virulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive. Pour vérifier que cette absence totale de virulence n'est pas uniquement due à un défaut de motilité ou de sécrétion des exoenzymes mais est le résultat d'un désordre plus profond, des expériences de coinoculation de la souche sauvage avec le mutant *opg* sur tubercules de pomme de terre ont été réalisées. Contrairement à un mutant *outS*, défectueux dans la sécrétion, ou à un mutant *msrA*, défectueux dans la motilité, qui montrent une croissance normale, les mutants *opg* ne peuvent pas croître même en présence de la souche sauvage.

Pour mieux comprendre les phénotypes du mutant *opg*, Franck Bouchart a recherché des mutations suppressives du phénotype Opg^- par mutagenèse à la nitrosoguanidine de la souche *opgG*. Il a isolé un supprimeur qui permet de restaurer une majorité des phénotypes d'un mutant *opg* : restauration de la motilité, absence de mucosité, restauration partielle de la résistance aux sels biliaires, restauration de la sécrétion des exoenzymes, restauration de la virulence sur tubercules de pomme de terre mais pas sur feuilles d'endive. La restauration de la virulence dépend donc du tissu de la plante. Cette différence de virulence pourrait être due à des mécanismes de défense plus élaborés dans les feuilles que dans les organes de réserves comme les tubercules. En effet, un mutant *sodA*, codant une superoxyde dismutase, ne présentent aucune virulence sur feuilles de *Saintpaulia ionantha* mais une virulence normale sur tubercules de pomme de terre (Santos et coll., 2001). La mutation, *rscC2*, est localisée dans le gène *rscC* codant le capteur d'un système à 2 composants. Il s'agit d'un changement de l'alanine 463 en valine sur la protéine RcsC comprenant 935 acides aminés (Bouchart, 2006). Ce système a été mis en évidence lors de l'étude de la régulation des exopolysaccharides à un stress hyperosmotique (Gottesman et coll., 1985). Depuis il a été montré que ce système est impliqué dans la régulation de divers processus cellulaires et participe à la virulence chez les Entérobactéries (Majdalani et Gottesman, 2005). Ce système est induit lors de perturbations causées à l'enveloppe. En effet, les mutations *rfa* qui provoquent un défaut dans le LPS et *pgsA* qui cause une absence complète des phospholipides phosphatidylglycérol et cardiolipide active le système Rcs (Majdalani et coll., 2005 ; Shiba et coll., 2004). Cette relation entre les OPG et le système Rcs avait déjà été établie lors de l'étude de la régulation des exopolysaccharides chez *E. coli* (Ebel et coll., 1997). Après mutagenèse aléatoire par insertion de transposon et recherche de colonies muqueuses, ces auteurs ont montré que l'inactivation du gène *opgH*, isolé lors de cette mutagenèse, conduisait à une surexpression des exopolysaccharides. Cette surexpression est abolie si on introduit une mutation dans le gène *rscC*, *rscB* ou *rscA*. Ces auteurs en concluaient donc que la variation d'abondance des OPG serait le signal perçu par RcsC pour moduler l'expression des gènes de synthèse des exopolysaccharides.

III. Les systèmes à deux composants et le système Rcs

A. Les systèmes à deux composants

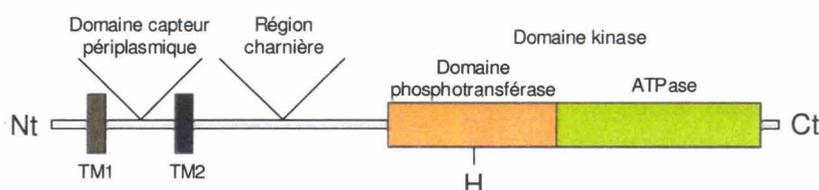
1. La transduction du signal

Les systèmes à deux composants sont généralement constitués de 2 protéines : un capteur généralement transmembranaire et un régulateur cytoplasmique. Les gènes codant le capteur et le régulateur sont le plus souvent organisés en opéron. Ces 2 protéines présentent chacune au moins deux domaines distincts. Le capteur transmembranaire possède en N-terminal un domaine périplasmique délimité par deux segments transmembranaires (TM1 et TM2), nécessaire à la reconnaissance du signal et un domaine cytoplasmique en C-terminal, appelé domaine kinase (Figure 9a). Le domaine cytoplasmique possède un premier sous domaine qui fixe l'ATP et permet l'autophosphorylation d'un résidu histidine conservé présent dans le second sous domaine, appelé domaine phosphotransférase de la kinase. Ces capteurs, aussi appelés « Histidine Kinase », fonctionneraient en homodimère. Il a été montré que dans le système EnvZ-OmpR chez *E. coli*, la dimérisation complète de EnvZ, c'est-à-dire de la partie périplasmique et cytoplasmique, est nécessaire pour sa fonctionnalité (Cai et Inouye, 2003). Le domaine phosphotransférase avec le résidu histidine phosphorylé va ensuite interagir avec la protéine régulatrice. Ce régulateur cytoplasmique contient aussi deux domaines (Figure 9c). Le premier domaine en N-terminal est un domaine receveur contenant un résidu aspartique sur lequel le phosphate, en provenance du capteur, va être transféré. Le second domaine en C-terminal est un domaine régulateur qui permet la fixation de cette protéine à des zones régulatrices de l'ADN menant à une expression différentielle de gènes spécifiques. La phosphorylation de la protéine régulatrice conduit à des changements de conformation favorisant l'interaction de cette protéine à l'ADN. Parfois le capteur transmembranaire peut posséder, dans la région charnière entre le TM2 et le domaine kinase, d'autres domaines modulant son activité tels que le domaine PAS, qui pourrait percevoir des stimuli d'origine cytoplasmique (petites molécules, protéines, niveau d'oxidoréduction) (Neiditch et coll., 2005) ou le domaine HAMP. De plus, les capteurs transmembranaires peuvent nécessiter des domaines de phosphorylation supplémentaires constitués d'un domaine receveur comme celui des protéines régulatrices avec un résidu aspartique et un domaine transmetteur additionnel appelé le domaine HPt pour « Histidine-containing phosphotransfer ». Ces domaines supplémentaires sont présents sur le capteur ou font appel à une protéine additionnelle

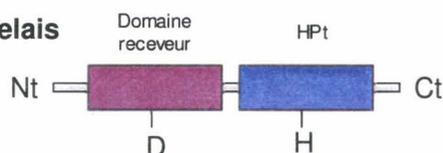
intermédiaire entre le capteur et le régulateur. Ces protéines sont alors appelées, par certains auteurs, des phosphorelais (Avarind et Ponting, 1999) (Figure 9b).

E. coli possède 30 protéines HK et 34 protéines RR (Yamamoto et coll., 2005). Chez *E. chrysanthemi*, 32 systèmes sont présents dont 2 présentent un capteur cytoplasmique (Bohin JP, communication personnelle).

(a) Capteur transmembranaire



(b) Phosphorelais



(c) Protéine régulatrice

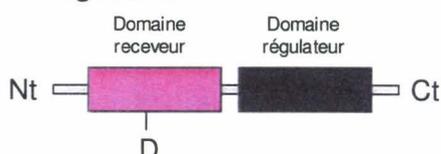


Figure 9 : Représentation des différents domaines des protéines constituant les systèmes à 2 composants. Les systèmes à 2 composants sont constitués : (a) d'une protéine qui perçoit le signal, le capteur transmembranaire, (b) parfois celle-ci nécessite des domaines de phosphorylation supplémentaires, on les appelle alors des phosphorelais et (c) d'une protéine régulatrice.

2. La nature du signal perçu

Les stimuli perçus par le domaine capteur périplasmique des « Histidine Kinase » restent, pour la majorité des systèmes, à identifier. Cependant pour quelques uns, la nature du signal est élucidée.

Le mécanisme de détection des signaux consiste à l'interaction directe entre le domaine capteur et une molécule chimiquement définie. Chez les Protéobactéries, NarX et NarQ

détection de la présence de nitrates et de nitrites environnementaux. Les systèmes NarX-NarL et NarQ-NarP contrôlent les gènes impliqués dans la respiration anaérobie (Stewart, 2003).

Chez *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*, le citrate interagit avec la boucle périplasmique de la protéine kinase CitA du système CitA-CitB pour réguler les gènes impliqués dans l'utilisation du citrate (Kaspar et coll., 1999 ; Kaspar et Bott, 2002). De même, chez *E. coli*, DcuS du couple DcuS-DcuR répond à la présence de citrate ou d'acide C4-dicarboxylique (Pappalardo et coll., 2003).

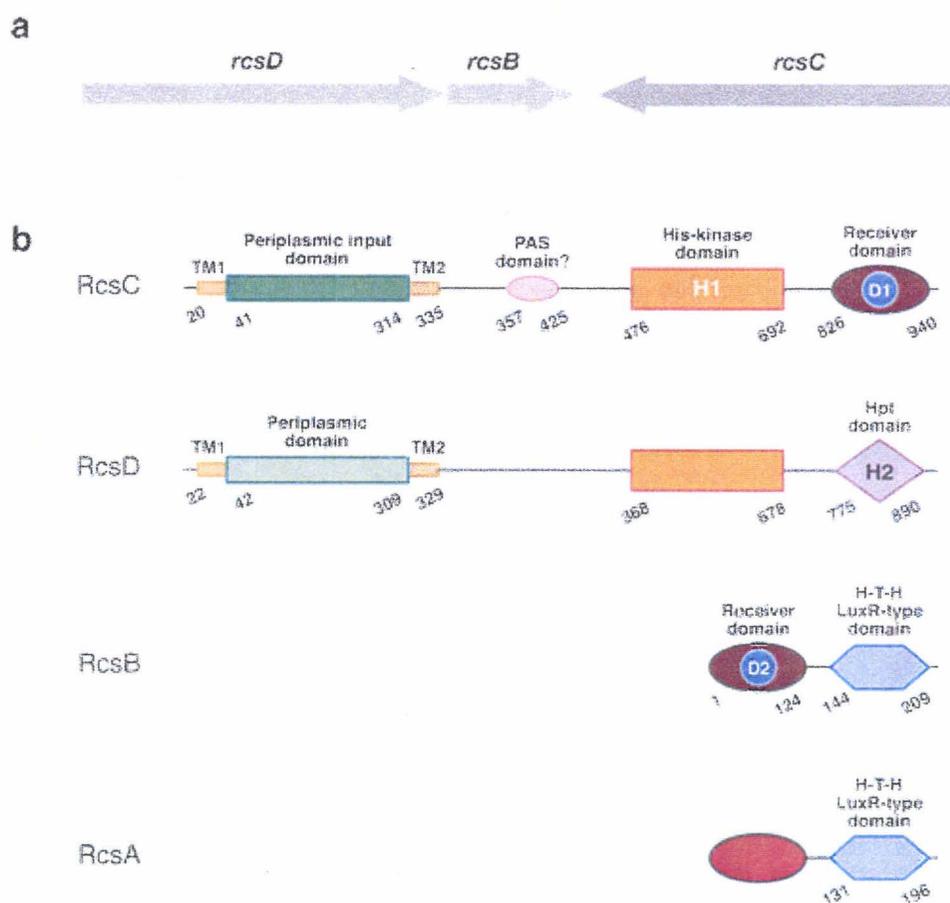
Dans d'autres cas, les stimuli chimiques sont perçus par l'interaction avec une protéine périplasmique qui fixe la molécule. Par exemple, lors d'une blessure de la plante, les cellules végétales provoquent une acidification du milieu et exsudent des monosaccharides. La protéine ChvE de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* fixe ces monosaccharides, et interagit ensuite avec le domaine périplasmique de VirA, protéine kinase d'un système à deux composants VirA-VirG régulant l'expression des gènes de virulence en réponse à un pH acide (Shimoda et coll., 1993).

Le domaine périplasmique peut aussi réagir à un signal mécanique, électrochimique ou à un gradient de concentration entraînant un changement de conformation de ce domaine. En effet, un des systèmes les plus étudiés est le système EnvZ-OmpR, impliqué dans l'adaptation aux changements de l'osmolarité du milieu (Cai and Inouye, 2003). Peu de choses sont connues sur le mécanisme d'osmoréception par EnvZ mais des études sur un osmorécepteur de la levure montrent que celle-ci répond à la pression de turgescence (Reiser et coll., 2003).

Il a aussi été montré que certains systèmes à deux composants utilisent des protéines additionnelles qui transmettent le signal à l'histidine kinase mais le type exact du stimulus n'est pas connu. En effet, des lipoprotéines sont impliquées dans l'activation de systèmes à deux composants. Par exemple, chez *E. coli*, la lipoprotéine RcsF perçoit certains signaux au niveau de l'enveloppe et va les transmettre au système RcsCDB en agissant directement ou indirectement avec RcsC pour l'activer (Majdalani et coll., 2005). La lipoprotéine NlpE est nécessaire pour activer le système CpxA-CpxR impliqué dans la réponse à un stress de l'enveloppe (Otto et Silhavy, 2002) (voir paragraphe IV).

B. Le système RcsCDB et RcsF

Le système Rcs est un système phosphorelais composé de 3 protéines distinctes avec 4 domaines intervenant dans la transduction du signal. Les gènes codant les 3 protéines RcsC, RcsD et RcsB sont organisés en opéron (Figure 10a). RcsC (105 kDa) est un capteur transmembranaire possédant 2 segments transmembranaires séparés par une région périplasmique qui percevrait les signaux environnementaux. La partie cytoplasmique en C-terminale possède un domaine PAS, un domaine histidine kinase avec un résidu histidine phosphorylable (H1) et un domaine receveur avec un résidu aspartate phosphorylable (D1) (Figure 10b). RcsD (100 kDa) est aussi une protéine transmembranaire contenant 2 domaines transmembranaires, un domaine périplasmique et un domaine cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique ne possède qu'un domaine transmetteur de phosphate avec une histidine phosphorylable (H2) (Figure 10b). La région périplasmique quant à elle pourrait participer à la perception de signaux en association avec celle de RcsC ou de manière autonome. Enfin RcsB (24 kDa) est le régulateur cytoplasmique possédant un domaine receveur de contenant un résidu aspartate phosphorylable (D2) et un domaine de liaison aux séquences d'ADN régulatrices des gènes cibles (Figure 10b).



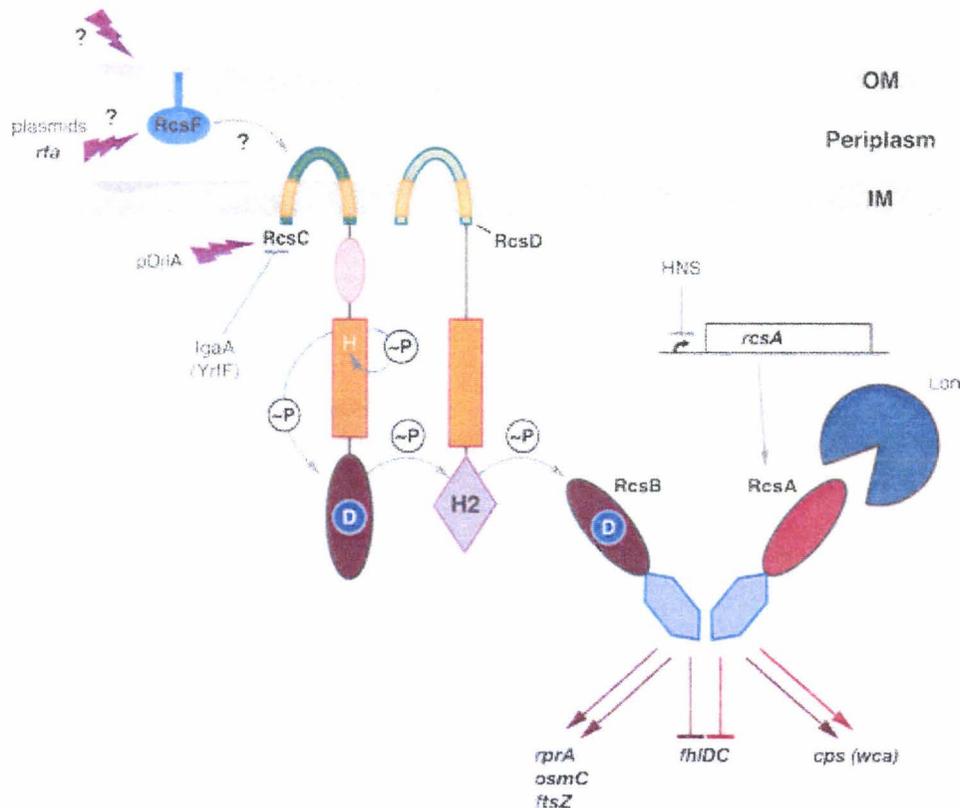
Madjalani N, Gottesman S. 2005.
Annu. Rev. Microbiol. 59:370-405

Figure 10 : Le système phosphorelais Rcs. (a) L'organisation des gènes *rcs*. (b) L'organisation des domaines des protéines du système Rcs et RcsA, d'après Madjalani et Gottesman, 2005.

Après perception du signal par RcsC et/ou par RcsD, l'histidine H1 de la protéine RcsC est phosphorylée. Ce phosphate est transmis au résidu aspartate D1 de cette même protéine puis à l'histidine H2 de RcsD et enfin au résidu aspartate D2 de RcsB (Figure 11) (Stout et Gottesman, 1990; Takeda et coll., 2001). La déphosphorylation emprunterait le chemin inverse. Chez *E. coli* et d'autres Entérobactéries, RcsB peut interagir soit seul, soit en hétérodimère avec la protéine RcsA suivant les gènes cibles (Wehland et Bernhard, 2000).

Le système Rcs est impliqué dans la régulation d'une variété de processus cellulaires. Chez *E. coli*, la protéine RcsB active seule l'expression de gènes de division cellulaire *ftsA* et *ftsZ* (Carballès et coll., 1999) alors qu'il active avec RcsA la synthèse des exopolysaccharides et

réprime la synthèse des flagelles, donc la motilité, en réprimant l'opéron *flhDC* (Francez-Charlot et coll., 2003). Ce système RcsCDB active aussi un petit ARN régulateur, RprA qui régule lui-même le niveau du facteur sigma RpoS (σ^S). Le système Rcs contrôle donc en partie et indirectement les gènes régulés par ce facteur σ (Majdalani et coll., 2002). Chez *E. coli*, il participe aussi à certaines étapes de l'élaboration des biofilms (Francez-Charlot et coll., 2005). Chez les Entérobactéries pathogènes, le système RcsCDB est impliqué dans la virulence. En effet, le système Rcs est important pour la virulence de *Salmonella* (Mouslim et coll., 2004), pour celle des souches d'*E. coli* entérohémorragiques (Tobe et coll., 2005), pour *E. amylovora* (Bereswill et Geider, 1997) et pour *Yersinia enterocolitica* (Venecia et Young, 2005).



Majdalani N, Gottesman S, 2005
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1057: 403

Figure 11 : Modèle de la voie de transduction du signal pour le système RcsCDB dépendant ou indépendant de RcsA, d'après Madjalani et Gottesman, 2005.

Contrairement à *E. amylovora*, chez *E. chrysanthemi* et *E. corotovora*, le gène *rcsA* est absent. La protéine RcsB agit donc seule ou associée à une ou des protéines, encore inconnues, pour moduler l'activité de gènes correspondants. Chez *E. amylovora*, une surexpression de la protéine RcsB supprime un mutant *rcsA* mais RcsA ne peut pas supprimer un mutant *rcsB*. De plus, un mutant *rcsB* présente une avirulence sur les plantes hôtes malgré la présence de RcsA (Bereswill et Geider, 1997). RcsB est donc essentielle au système.

Chez *E. coli*, la surexpression de 2 protéines est capable d'activer RcsC : la première est DjlA, une protéine de la membrane interne (Clarke et coll., 1997) et la seconde est RcsF. RcsF est une lipoprotéine (14 kDa) de la membrane externe. Cette lipoprotéine joue un rôle dans la transduction du signal de la surface cellulaire vers RcsC (Figure 11) (Majdalani et coll., 2005 ; Castanié-Cornet MP et coll., 2006). Chez *Salmonella enterica*, la protéine transmembranaire IgaA (« intracellular growth attenuator ») encore appelée YrfF, réprime l'activité de RcsC (Cano et coll., 2002) de façon indépendante de RcsF. Ces 3 protéines sont présentes chez *E. chrysanthemi*.

Chez *E. chrysanthemi*, la mutation suppressive *rscC2* se situe dans la partie cytoplasmique en C-terminale entre le domaine PAS et le domaine histidine kinase (Figure 12). Le phénotype de la souche *rscC2* dans un contexte *Opg*⁺ a été analysé. Ce mutant produit presque 2 fois moins d'OPG, sécrètent plus de pectinases et il est hyperrésistant aux sels biliars. On observe également une hypervirulence sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive. C'est à notre connaissance, le premier mutant du système Rcs stimulant la virulence d'une entérobactérie pathogène.

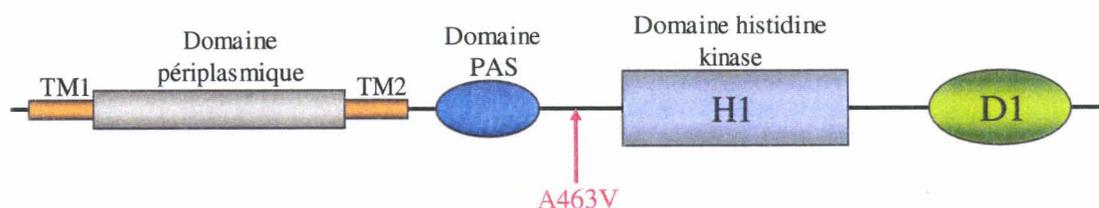


Figure 12 : Organisation des différents domaines de la protéine RcsC avec représenté en rouge la mutation *rscC2* avec un changement de l'alanine 463 en valine. Schéma réalisé d'après la représentation obtenue grâce au logiciel SMART d'Infobiogen.

L'ensemble des phénotypes d'un mutant Opg^- suggère une augmentation du taux de RcsB phosphorylé par RcsCD. L'absence d'OPG induirait l'augmentation du rapport kinase/phosphatase de RcsCD. Dans un contexte *opgG*, la protéine RcsC2, baisserait le niveau de phosphorylation de RcsB pour le rendre compatible avec un développement satisfaisant de la bactérie dans un grand nombre de conditions. Par contre dans un contexte *rscC2*, cette baisse globale de phosphorylation conduirait à une hypervirulence dans plusieurs types de tissus.

C. D'autres systèmes à 2 composants chez les *Erwiniae*

Chez *E. carotovora*, 3 systèmes à deux composants affectant la virulence ont été caractérisés.

Le système ExpA-ExpS est homologue au système GacA-GacS. Ce dernier est présent dans une variété de bactéries à Gram négatif et étudié principalement chez les Entérobactéries et les *Pseudomonas*. C'est un régulateur global qui contrôle notamment la production d'enzymes extracellulaires impliquées dans la pathogénie des plantes et des animaux (Heeb et Haas, 2001). Des mutants *expA* présentent une virulence réduite sur tubercules de pomme de terre et une diminution de la production des enzymes extracellulaires (Ericksson et coll., 1998).

Le système PehS-PehR contrôle la synthèse des polygalacturonases (Peh). Ce système est similaire au système PhoP-PhoQ de *E. coli* et de *S. typhimurium*. Des mutations dans le gène *pehS* ou *pehR* provoquent une virulence atténuée sur le tabac et la concentration en Ca^{2+} et en Mg^{2+} est perçue comme un signal environnemental spécifique dans la régulation d'une endopolygalacturonase, PehA (Flego et coll., 2000).

Le dernier est le système PmrA-PmrB, homologue à celui de *S. typhimurium*. Ce système chez *Samonella*, permet la résistance à la polymixine B. Des mutants *pmrA* ou *pmrB* chez *E. carotovora* présentent une diminution de leur virulence sur tubercules de pomme de terre. Ce système est activé par un excès de fer en pH acide (Hyytiäinen et coll., 2003).

Chez *E. chrysanthemi*, un seul système à 2 composants affectant la virulence a été étudié, le système PhoP-PhoQ. Un mutant *phoQ* présente une réduction de survie dans les tissus végétaux à cause d'une sensibilité accrue au pH acide et une réduction de sa virulence sur feuilles d'endive. Ce système est induit dans la plante mais aussi par une faible concentration en Mg^{2+} (Llama-Palacios et coll., 2003).

IV. La réponse au stress de l'enveloppe

L'ensemble des phénotypes causés par l'absence d'OPG et la nature du premier suppresseur mis en évidence suggère un stress de l'enveloppe causé par une altération de la structure de celle-ci. Cette altération a pour conséquence une modification de la perception de l'environnement de la bactérie. Or l'adaptation des bactéries passe par une perception des variations de l'environnement. Dans un grand nombre de cas, cette perception passe par des systèmes à 2 composants (Hoch, 2000). Ces systèmes jouent donc un rôle important, en particulier, pour la symbiose ou la pathogénèse. L'enveloppe des mutants *opgG* étant perturbée, on peut imaginer une perturbation du fonctionnement des systèmes à 2 composants dont le capteur est dans la membrane interne. L'adaptation à de nouvelles conditions est donc rendue plus difficile, ce qui permet d'expliquer l'absence de virulence. La réponse au stress de l'enveloppe a été bien étudiée chez *E. coli* et implique trois voies principales. Deux de ces voies passent par des systèmes à 2 composants et la dernière passe par un facteur sigma alternatif, le facteur σ^E .

A. La voie σ^E

La voie σ^E est surtout activée lors de la présence dans le périplasme de protéines de l'enveloppe mal conformées apparues suite à diverses conditions (chaleur, éthanol, surexpression de OMP,...) (Raivio et Silhavy, 2001).

Le facteur σ^E est contrôlé par un facteur antisigma appelé RseA. RseA est une protéine de la membrane interne avec un domaine cytoplasmique qui interagit avec σ^E et le rend inactif par sa séquestration au niveau de la membrane interne et un domaine périplasmique qui interagit avec la protéine périplasmique RseB. La protéine RseB est un régulateur négatif qui joue un rôle important dans la prévention d'une dégradation inappropriée de RseA en absence de stress de l'enveloppe (Grigorova et coll., 2004).

Dans des conditions qui activent la voie σ^E , RseB est séquestrée par les protéines mal conformées libérant ainsi RseA. La protéine RseA est alors dégradée par une cascade protéolytique. En effet, RseA est d'abord dégradée sur sa face périplasmique par la protéase DegS. DegS est une protéine insérée dans la membrane interne avec un domaine périplasmique. Puis RseA est dégradée par une seconde protéase, RseP sur sa face cytoplasmique. RseP est une protéine ancrée dans la membrane qui clive les protéines

membranaires du coté cytoplasmique. La dégradation de RseA par DegS puis par RseP permet de libérer le complexe composé de la partie cytoplasmique de RseA avec le facteur σ^E . Le fragment cytoplasmique de RseA sera dégradé par la protéase cytoplasmique ClpXP libérant ainsi le facteur σ^E actif (Raivio, 2006).

Le facteur σ^E actif se fixe à l'ARN polymérase et active la transcription de nombreux gènes (Figure 13). La voie σ^E induit des gènes impliqués dans la synthèse du LPS (*lpxA*, *lpxB*, *lpxD*, *bacA*,...), des gènes codant des protéines chaperons (*fkpA*, *surA*, *degP*, *skp*), les gènes *rpoErseABC* codant le facteur σ^E et ses régulateurs, le gène *rpoH* codant le facteur σ^H activé en réponse à un choc thermique et aussi les gènes *opgG* et *opgH* impliqués dans la biosynthèse des OPG (Dartigalongue et coll., 2001 ; Rhodius et coll., 2006).

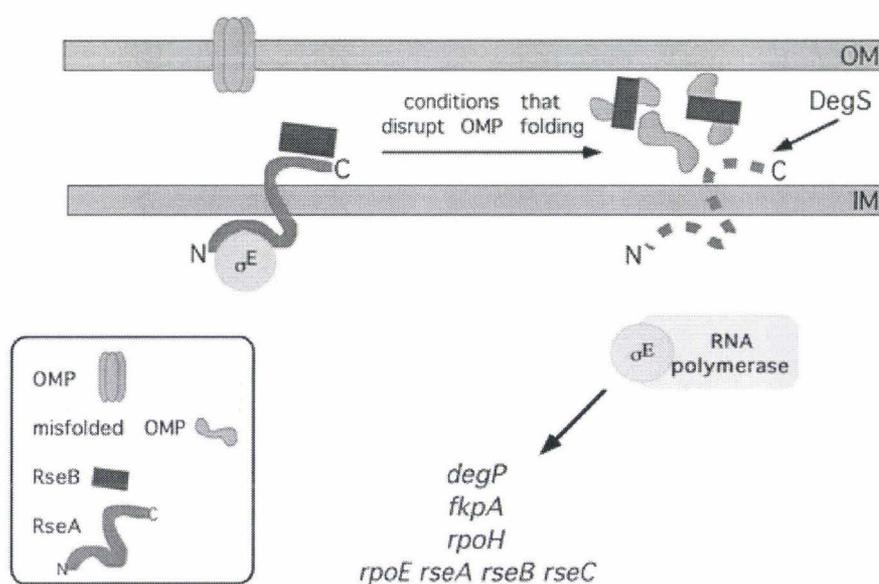


Figure 13 : La voie σ^E de transduction d'un stress de l'enveloppe, d'après Raivio et Silhavy en 2001.

B. Les systèmes à deux composants

1. Le système CpxAR

La voie Cpx est principalement activée par des perturbations générales de l'enveloppe (pH élevé, EDTA, déficience en phosphoéthanolamine,...), par la surexpression de protéines de

l'enveloppe (NlpE, MalE mais aussi des sous unités des pili) et par l'attachement à des surfaces abiotiques ou hydrophobes (Raivio, 2006). L'ensemble de ces conditions affectent la conformation des protéines de l'enveloppe.

Le système Cpx est un système à 2 composants composé d'un capteur membranaire, CpxA et d'un régulateur cytoplasmique, CpxR. Une autre molécule périplasmique, CpxP, impliquée dans le contrôle de l'activité de la voie Cpx a été identifiée (Danese et Silhavy, 1998). En absence de stress de l'enveloppe, CpxP se fixe à CpxA et l'inhibe (Raivio et coll., 2000). Cependant CpxP n'apparaît pas nécessaire pour la transduction du signal car quand *cpxP* est absent ou surexprimé, la voie Cpx peut être induite (Raivio et coll., 1999). Silhavy et ses collègues ont émis 2 hypothèses quant au rôle de CpxP : soit CpxP fonctionne comme une protéine chaperon pour se fixer aux protéines mal conformées et les emmène pour être dégradées par DegP, soit la protéine CpxP elle-même devient une protéine mal conformée en condition de stress de l'enveloppe et devient un substrat pour DegP.

CpxA induit s'autophosphoryle et transfère son phosphate à CpxR. CpxR phosphorylé va alors réguler la transcription de nombreux gènes (Figure 14). Les premiers gènes identifiés comme étant régulés par CpxR sont *degP*, *dsbA* et *ppiA*. La comparaison de la région de fixation de CpxR de ses 3 gènes a permis d'identifier un site consensus de fixation de CpxR. En utilisant cette séquence, d'autres gènes ont pu être identifiés (*motABcheAW*, *tsr*, *ppiD*, *cpxAR*, *cpxP*,...) (Raivio, 2006). Ainsi Cpx régule des gènes intervenant dans la dégradation (*degP*) et la conformation de protéines de l'enveloppe (*dsbA*, *ppiA* et *ppiD*), dans la transduction du signal (*cpxP* et *cpxRA*), dans la motilité (*motABcheAW*) et dans le chimiotactisme (*tsr*). Les gènes impliqués dans ces 2 dernières fonctions sont inhibés par CpxR alors que les autres sont activés. D'autres gènes ont ensuite été trouvés comme étant régulés par Cpx (*rpoH* codant le facteur σ^H , *skp* codant une protéine chaperon périplasmique, *rpoErseABC* codant σ^E et ses régulateurs et *spy* dont la fonction est inconnue) (De Wulf et coll., 2002).

Ainsi les voies σ^E et Cpx sont activées par la présence de protéines de l'enveloppe mal conformées. Les 2 systèmes répondent en partie à des conditions différentes et régulent en partie des systèmes différents. En effet, la voie σ^E n'est pas activée par la surproduction de la lipoprotéine NlpE et la voie Cpx n'est pas induite par la présence de OMP mal conformées (Danese et coll., 1995). Par contre, la surexpression de la protéine PapG et l'accumulation du

précurseur du lipide II de l'antigène commun d'*E. coli* activent les 2 voies. De plus, les 2 systèmes activent les gènes *degP*, *rpoH*, *rpoErseABC* et *skp*.

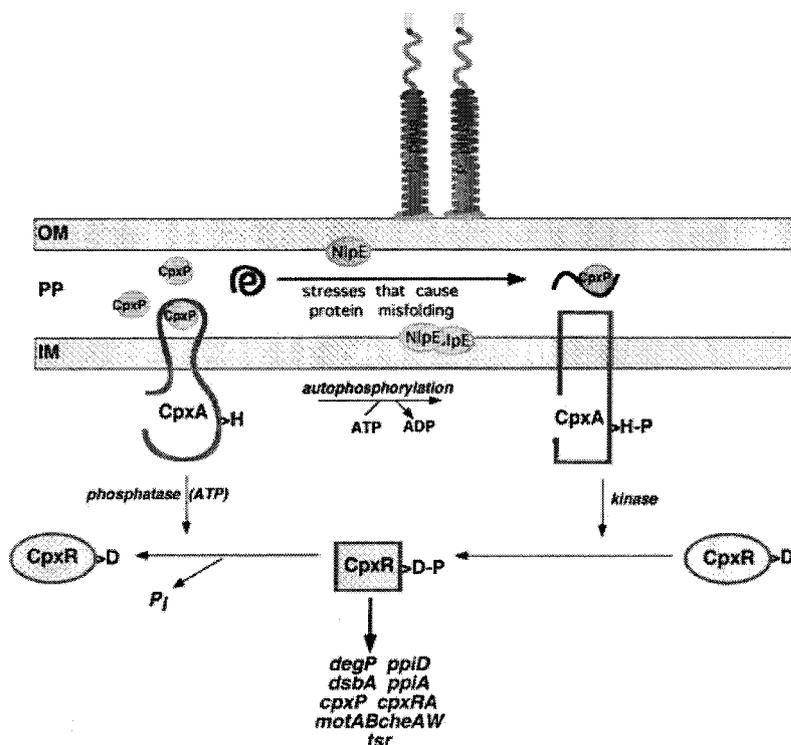


Figure 14 : Transduction d'un stress de l'enveloppe par la système à 2 composants CpxA-CpxR, d'après Raivio et Silhavy, 2001.

2. Le système BaeSR

La dernière voie impliquée dans la réponse à un stress de l'enveloppe concerne également un système à 2 composants composé de BaeS, le capteur transmembranaire, et de BaeR, le régulateur cytoplasmique. Cette voie a été initialement identifiée par ses capacités à induire l'expression du gène *spy* en réponse à des conditions induisant la voie Cpx dans un mutant *cpxAR* (Raffa et Raivio, 2002). Ce système semble donc interagir avec la voie Cpx en réponse à certaines conditions. Récemment il a été montré que suite à induction par l'indole, l'augmentation de l'expression des gènes *mdtABC* et *acrD*, codant des composants de pompe à efflux de multidrogues, est médiée à la fois par les voies Cpx et Bae (Hirakawa et coll.,

2005). La réponse Cpx jouerait un rôle accessoire dans l'induction des pompes à efflux en augmentant l'activation médiée par BaeR de ces gènes.

IV. Les objectifs du travail

Les systèmes à 2 composants sont donc les principaux systèmes impliqués dans la perception des changements environnementaux par la bactérie. Parmi eux, le système Rcs apparaît comme étant un système important pour le bon déroulement du processus infectieux chez les entérobactéries. L'altération ou l'absence d'un des composés de l'enveloppe modifie les propriétés de celle-ci et entraîne certaines perturbations, comme nous l'avons observé chez un mutant *opg*. L'étude d'un révertant du phénotype Opg^- , *rscC2*, a permis de mettre en évidence une relation entre les OPG et le système Rcs. L'absence d'OPG conduit à un dysfonctionnement du système Rcs et par conséquent, une modification de l'expression de gènes cibles.

Toujours dans le but de mieux comprendre le rôle des OPG, mon travail a consisté à une analyse protéomique du mutant *opgG*. Lors de cette étude, nous avons mis en évidence une protéine abondante, une galactanase. J'ai pu ainsi caractériser un nouveau système impliqué dans le catabolisme des galactanes, un des constituants de la pectine. J'ai ensuite travaillé sur le système Rcs en réalisant l'analyse protéomique d'un mutant *rscC2* et en initiant des études d'interaction de la protéine RcsC avec RcsF mais aussi avec les OPG.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

I. Souches, milieux et conditions de croissance

A. Les souches bactériennes utilisées

Les souches d'*E. chrysanthemi* et d'*E. coli* sont décrites respectivement dans le tableau 1 et le tableau 2.

B. Les plasmides utilisés

Les plasmides utilisés sont décrits dans le tableau 3.

C. Les milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

Les souches d'*E. coli* et d'*E. chrysanthemi* sont cultivées respectivement à 37°C et à 30°C, sous agitation à 140 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. Les deux milieux de culture utilisés sont le milieu LB (Luria Broth) et le milieu 63 (Miller, 1992). Le milieu LB est aussi utilisé sans NaCl (LB-NaCl) afin d'avoir un milieu d'osmolarité réduite (150 mosM). Le milieu 63 est un milieu minimum complété par les métabolites nécessaires à la croissance des différentes souches : les acides aminés et bases azotées à 40 mg/mL, la thiamine à 2 mg/mL et la source de carbone à 2 g/L. Par contre, le polygalacturonate est ajouté à une concentration de 4 g/L. Les extraits de pommes de terre ou de feuilles d'endive sont obtenus en broyant les produits puis en centrifugeant à 4°C pendant 10 min à 4000 g. Le surnageant est ensuite stérilisé sur filtre de 0,45 µm (Millipore). Ces extraits sont ajoutés dans le milieu de culture à une concentration de 10 % (vol/vol).

Ces milieux sont solidifiés par l'ajout d'agar à 15 g/L. Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finales suivantes : ampicilline (Amp) et kanamycine (Kan) à 50 µg/mL pour *E. coli* et à 25 µg/mL pour *E. chrysanthemi*, chloramphénicol (CmL) et Tétracycline (Tet) à 25 µg/mL pour *E. coli* et à 12.5 µg/mL pour *E. chrysanthemi*.

Souches	Génotype	Source et référence
A2507	A350, <i>lmrTc</i> , <i>lacZ2 crp::cmL</i>	Reverchon et coll, 1997
A350	<i>lacZ2</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll, 1992
A4415	EC3937, <i>pelD::uidA-kan</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll, 1992
A4807	EC3937, <i>ganB::uidA-kan</i>	Cette étude
A4809	EC3937, <i>ganA::uidA-kan</i>	Cette étude
A4810	EC3937, <i>ganE::uidA-kan</i>	Cette étude
A4863	EC3937, <i>ganR::cmL</i>	Cette étude
A4868	EC3937, <i>ganL::uidA-kan</i>	Cette étude
EC3937	sauvage	Collection du laboratoire
NFB3500	<i>opgG :: uidA-kan</i>	Collection du laboratoire
NFB3611	<i>resC2</i>	Collection du laboratoire
NFB3666	EC3937, <i>ganB::cmL</i>	Cette étude
NFB3674	EC3937, <i>ganB::cmL</i>	Cette étude
NFB3677	EC3937, <i>crp::cmL</i>	Cette étude
NFB3679	EC3937, <i>ganA::uidA-kan, crp::cmL</i>	Cette étude
NFB3680	EC3937, <i>lacZ ::cmL</i>	Collection du laboratoire
NFB3681	EC3937, <i>ganB::FRT</i>	Cette étude
NFB3687	EC3937, <i>lacZ::cmL, ganB::FRT</i>	Cette étude
NFB3701	EC3937, <i>ganK::uidA-kan</i>	Cette étude
NFB3703	EC3937, <i>ganK::uidA-kan, crp::cmL</i>	Cette étude
NFB3758	EC3937, <i>ganR::uidA-kan</i>	Cette étude
NFB3792	EC3937, <i>ganL::uidA-kan, crp::cmL</i>	Cette étude
NFB3793	EC3937, <i>ganE::uidA-kan, crp::cmL</i>	Cette étude

Tableau 1 : Les souches d'*E. chrysanthemi*.

Souches	Génotype	Source et référence
BL21/DE3	F', <i>opmT</i> , <i>hsdS'</i> (r ⁻ m ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3	Grodberg et coll, 1988
S17-1 λ pir	<i>recA1</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M+</i> , <i>RP4:2-Tc::Mu-Kan::Tn7</i> , λ pir	Lazzaroni
JM83	Δ (<i>lac-pro</i>), <i>ara</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , (ϕ 80 Δ <i>lacZ-M15</i>)	Vieira et Messing, 1982
TG1	F', <i>supE</i> / <i>traD36</i> , <i>proA+B+</i> , <i>lacIq</i> , Δ LacZM15, Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>thi</i> , <i>hsdDEL5</i>	Collection du laboratoire
NFB3211	S17-1 λ pir, pNFW179	Collection du laboratoire
NFB3199	TG1, pNFW168	Cette étude
NFB3207	TG1, pNFW176	Collection du laboratoire
NFB3231	TG1, pNFW195	Cette étude
NFB3233	BL21/DE3, pNFW194	Cette étude
NFB3249	BL21/DE3, pNFW210	Cette étude
NFB3257	JM83, pNFW217	Cette étude
NFB3258	JM83, pNFW218	Cette étude
NFB3259	NFB4502, pNFW217	Cette étude
NFB3260	NFB4502, pNFW218	Cette étude
NFB4502	JM83, <i>opgGH::cmL</i>	Collection du laboratoire

Tableau 2 : Les souches d'*E. coli*.

Plasmides	Caractéristiques	Source et référence
pET-29a (+)	Kan ^R , fusion avec une étiquette polyhistidine en C-terminal, Promoteur pT7	Novagen (annexe 1)
pGEX-6P	Amp ^R , fusion avec la GST en N-terminal, Promoteur ptac	GE healthcare (annexe 2)
pNFW168	PGEX-6P, boucle périplasmique de RcsC d' <i>E. chrysanthemi</i> entre BamHI et EcoRI	Cette étude (page 47 F2)
pNFW176	pXFD11, RcsF d' <i>E. chrysanthemi</i> sans la partie lipidique entre SacI et EcoRI	Collection du laboratoire
pNFW179	pUTmini Tn5-Tet ^R , fragment EcoRI-MLuI de pNFW176	Collection du laboratoire
pNFW194	pET-29a, boucle périplasmique de RcsD d' <i>E. chrysanthemi</i> entre NdeI et XhoI	Cette étude (page 47 F1)
pNFW195	PGEX-6P, boucle périplasmique de RcsD d' <i>E. chrysanthemi</i> entre NdeI et XhoI	Cette étude (page 47 F2)
pNFW210	pET-29a, boucle périplasmique de RcsC d' <i>E. chrysanthemi</i> entre NdeI et XhoI	Cette étude (page 47 F1)
pNFW217	pXFD11, boucle périplasmique de RcsC d' <i>E. chrysanthemi</i> avec une queue histidine entre SacI et EcoRI	Cette étude (page 49 H)
pNFW218	pXFD11, boucle périplasmique de RcsD d' <i>E. chrysanthemi</i> avec une queue polyhistidine entre SacI et EcoRI	Cette étude (page 49 H)
pUTminiTn5-Tet ^R	Amp ^R , Tet ^R	De Lorenzo et coll, 1990
pXfd11	pYZA, séquence signal d'OpgD de <i>Xylella fastidiosa</i> entre NcoI et SacI devant <i>blaM</i> entre SacI et EcoRI	Collection du laboratoire
pYZA	Kan ^R	Zhang et Broome-Smith, 1990

Tableau 3 : Les plasmides utilisés.

Le X-Gal (5bromo-4chloro-3indolyl- β -D-galactopyranoside) est utilisé à une concentration de 20 $\mu\text{g/mL}$. L'AZCL-galactane (« Azurine-crosslinked galactan », Megazyme, Bray, Irlande) est composé de particules en suspension qui sont étalées en surcouche à 2 g/l sur un milieu solide contenant du glycérol comme source de carbone. La dégradation de ce substrat génère un halo bleu diffusible.

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

Les observations microscopiques des bactéries sont réalisées après avoir centrifugé 500 μL de la suspension bactérienne et repris le culot par 300 μL de gélatine 5 % afin immobiliser les cellules sur la lame.

II. Techniques de protéomique

A. Extraction des protéines membranaires et solubles

Un litre de culture en LB sans NaCl est arrêté en phase exponentielle de croissance à une DO de 0,6. Après une centrifugation à 7000 g pendant 20 min à 4°C , le culot est lavé par 500 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 8. Les cellules sont centrifugées à 7000 g à 4°C pendant 20 min pour reprendre le culot par 25 mL de tampon composé de phosphate de potassium pH 6,6 0,1 M, de MgSO_4 20 mM et d'un cocktail d'antiprotéases (Complete, ROCHE). Les cellules sont ensuite cassées par deux passages en presse de French à $1,4 \cdot 10^7$ Pascal. Les bactéries intactes sont éliminées par centrifugation à 3000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 16000 g à 4°C 30 min pour séparer la fraction membranaire de la fraction soluble. Le culot membranaire est repris par le même volume de tampon phosphate pH 6,6, 1 M, MgCl_2 20 mM, RNase 10 $\mu\text{g/mL}$, DNase 10 $\mu\text{g/mL}$ que le surnageant. De la DNase et RNase à 10 $\mu\text{g/mL}$ sont ajoutées dans la fraction soluble et la fraction membranaire puis ces fractions sont incubées à 4°C 30 min. Ces deux fractions sont centrifugées à 45000 g 30 min à 4°C . Le surnageant de la partie soluble est aliquoté. Le culot membranaire est resuspendu dans du tampon phosphate de potassium pH 6,6 0,1 M, MgSO_4 20 mM et un cocktail d'antiprotéases. Un potter est utilisé pour homogénéiser cette suspension qui est ensuite aliquotée. Ces aliquots sont conservés à -80°C .

B. Extraction des protéines périplasmiques

Cette extraction est basée sur la méthode d'Ames (1984). Après une nuit de culture dans le milieu LB sans NaCl, 5 mL de culture sont centrifugés à 3000 g pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 50 µL de chloroforme en vortexant délicatement. Après 15 min à température ambiante, on ajoute de 500 µL de Tris/HCl pH 8 0,01 M. Cette suspension est centrifugée à 7500 g pendant 15 min à 4°C pour éliminer les bactéries. Le surnageant est alors aliquoté et conservé à -80°C.

C. Dosage des protéines

Le dosage de protéines est réalisé par la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad protein assay) avec une solution de sérum-albumine bovine comme référence pour réaliser la gamme de concentration comprise entre 0 et 20 mg/L.

D. Electrophorèse monodimensionnelle

Les extraits protéiques sont dilués deux fois dans le tampon Laemmli (Tris-HCl 65 mM pH 6,8, SDS 2,5 %, DTT 2,5 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol) et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 % (Acrylamide/Bis-acrylamide 40 % 19:1) en présence de SDS à 10 % (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

E. Electrophorèse bidimensionnelle

Les protéines sont précipitées par de l'acétone froide à 80 %, lavées par de l'éthanol 75 % puis solubilisées dans le tampon de solubilisation (urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 4 %, DTT 65 mM, Triton X100 0,25 mM, antiprotéases) à une concentration de 1,5 mg/mL. 200µL de tampon de réhydratation (urée 8 M, thiourée 2 M, CHAPS 2 %, DTT 100 mM, ampholytes 5 %, bleu de bromophénol) sont additionnés aux 200 µL de protéines dans le tampon de solubilisation (soit 300 µg de protéines dans les 400 µL final). Les bandelettes (18 cm) sont réhydratées une nuit avec ces 400 µL. Puis celles-ci sont soumises à une électrofocalisation pendant 24h à 100000 V/h de 0 à 5000 V suivant les modalités du fournisseur (pHaser Isoelectric Focusing System, Genomic solutions). Après migration, les bandelettes sont déposées dans du tampon d'équilibration (urée 6 M, glycérol 30 %, SDS 2 %, Tris-HCl 0.375 M pH 8,8, DTT 2 %, bleu de bromophénol) pendant 20 min. Enfin, elles sont déposées sur un gel SDS-PAGE à 12% pour la seconde dimension.

F. Coloration des gels

Nous avons utilisé deux techniques de coloration différentes. La coloration au nitrate d'argent est effectuée selon la méthode de Rabilloud (1999). La coloration au bleu de Coomassie R250 est réalisée selon la méthode de Bradford (1976).

G. Analyse informatique des gels

L'analyse informatique des gels est réalisée par le logiciel « Melanie Image Master 2D platinum 5 » (GE Healthcare) sur 3 gels pour chaque condition. Le profil du protéome de la souche sauvage EC3937 est utilisé comme référence pour l'analyse des spots.

H. Identification des protéines

Les spots protéiques d'intérêt sont excisés des gels puis soumis à une digestion trypsique dans le gel. Les morceaux de gel découpés sont d'abord lavés 3 fois avec une solution de NH_4HCO_3 25 mM. Après un dernier lavage avec NH_4HCO_3 25 mM / acétonitrile (1:1), les gels sont totalement déshydratés puis réhydratés par 10 μL d'une solution de trypsine à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du NH_4HCO_3 25 mM. Les gels sont ensuite recouverts par du NH_4HCO_3 25 mM et laissés une nuit à 37°C. L'hydrolysate peptidique est récupéré dans le surnageant et en effectuant deux lavages des morceaux de gel avec de l'eau contenant 1 % d'acide formique puis avec de l'eau / acétonitrile (1:1) et 1 % d'acide formique. Ces fractions sont rassemblées puis séchées et conservées à -20°C. Les peptides tryptiques sont repris par 10 μL d'acide formique 0,5 %, puis déposés sur la cible avec de la matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) à 10 mg/mL dans une solution de méthanol/eau (7 : 3). Après cristallisation, la cible est introduite dans le spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of flight). Les peptides sont analysés en mode Reflectron positif avec un laser (azote, 337 nm) entre 750 et 3500 Da. Grâce au logiciel MASCOT, l'empreinte peptidique massique obtenue pour chacune des protéines est comparée aux protéines de la banque d'*E. chrysanthemi* (<https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAPI.htm>).

III. Techniques de biochimie

A. Purification de GanA

La purification de GanA est réalisée à partir d'un extrait périplasmique d'environ 5 mg de protéines dans du Tris-HCl 20 mM pH 8, 0.1 M NaCl. Cet échantillon est déposé sur une colonne de filtration sur gel Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences). Les protéines sont éluées dans le même tampon. Chacune des fractions est testée avec le substrat AZO-galactane (Megazyme, Bray, Ireland) afin de détecter une activité 1,4- β -endogalactanase. Les fractions contenant cette activité sont rassemblées (environ 50 mL), ajustées à 100 mM de NaCl et appliquées sur une colonne échangeuse d'anions MonoQ HR 5/5 (Amersham Biosciences). Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl de 0,1 à 1 M. L'activité 1,4- β -endogalactanase est alors retrouvée dans la fraction non retenue. Cette fraction est concentrée 3 fois et puis analysée sur gel SDS-PAGE 10 %.

B. Détermination des activités enzymatiques

1. Les activités β -galactosidase et β -glucuronidase

Ces activités enzymatiques sont testées sur des extraits bruts de protéines obtenus après avoir cassé les cellules, en phase exponentielle de croissance ($DO=0,5$), par passage à la presse de French à $1,4 \cdot 10^7$ Pascal. Les activités β -galactosidase et β -glucuronidase sont déterminées en suivant respectivement l'hydrolyse de l'ONPG (orthonitrophenyl- β -D-galactoside) ou du PNPU (4-nitrophenyl- β -D-glucuronide) par lecture de l'absorbance à 410 nm.

2. L'activité 1,4- β -endogalactanase

L'activité 1,4- β -endogalactanase est déterminée par l'hydrolyse de l'AZO-galactane suivant les instructions du fabricant (Megazyme, Irlande). 200 μ L d'échantillon sont ajoutés aux 200 μ L d'AZO-galactanes 0,5 % préincubés à 50°C. La réaction est incubée pendant 15 min à 50°C puis stoppée par la précipitation des polymères de hauts poids moléculaire par l'ajout de 1 mL d'éthanol à 95 % pendant 10 min à température ambiante suivi de 10 min de centrifugation à 1000 g. L'absorbance des surnageants est mesurée à 590 nm. La dilution de GanA purifiée est réalisée dans du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,8.

L'hydrolyse des galactanes pectiques à 1 % (Megazyme, Bray, Irlande) est réalisée par l'enzyme GanA purifiée, 10 fois diluée dans du sodium acétate 0,2 M pH 5,8, à 50°C. L'activité est stoppée par l'inactivation enzymatique à 80°C pendant 5 min. Les produits de dégradation des galactanes par GanA sont analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mode positif (matrice DHB) ou de type Q-STAR (par électronébulisation, Adeline Page). Les oligogalactanes constitués de 3 à 6 résidus sont obtenus par hydrolyse complète des galactanes après 6 h de réaction.

C. Détermination du pH optimum et de la température optimale de GanA

L'activité 1,4- β -endogalactanase est mesurée à différents pH et différentes températures. Le pH optimum est étudié en incubant l'enzyme purifiée dans différents tampons d'incubations (sodium acétate, potassium phosphate ou TRIS) à 0,2 M afin d'avoir des pH compris entre 4 et 10. La température optimale est déterminée en incubant l'enzyme purifiée dans du sodium acétate 0,2 M pH 5,8 à des températures comprises entre 23 et 70°C.

D. Dosage des extrémités réductrices

Ce dosage s'effectue en présence d'un même volume de sucres et de DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique). Après 10 min à 100°C, le DNS est réduit et le spectre d'absorption à 540 nm est donc modifié (la couleur change du orange au marron).

E. Dosage des glucides

Les glucides sont dosés par la méthode à l'antrone (Spiro, 1966). La gamme étalon est réalisée en utilisant des quantités de 0 à 30 μ g de galactose. 500 μ L l'antrone sulfurique (2 g/L H₂SO₄ 100 %) sont ajoutés au 200 μ L de la solution de sucre. Après 5 min, on lit l'absorbance à 620 nm.

IV. Techniques de génétique

A. Construction des mutations dans le génome d'*E. chrysanthemi*

Les constructions des différents mutants en rapport avec le locus *gan* ont été réalisées soit par Anne-France Prouvost ou soit par Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. Les souches construites sont décrites dans le tableau 1.

B. Préparation des cellules compétentes

Les cellules compétentes sont préparées selon la méthode de Chung et coll, 1989. Les cellules effectuent leur croissance dans le milieu LB jusqu'à atteindre 6.10^8 cellules/mL. Les bactéries sont centrifugées à 1000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans 1/10^e du volume initial par du TSS. Le TSS est un milieu LB contenant 10 % de PEG (3500 ou 8000), 5 % (vol/vol) de DMSO 20-50 mM, MgCl 0,5 g. Les cellules compétentes peuvent être utilisées ou stockées par fraction de 200 µL à -80°C.

C. La transformation

Les cellules compétentes sont mélangées avec des volumes variables (5 à 50 µL) de ligation ou d'ADN plasmidique et placées pendant 30 min dans la glace. 800 µL de LB sont ensuite rajoutés et les cellules sont incubées à 30°C pendant 1 h. Les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé en présence de l'antibiotique adéquat.

D. Insertion d'un transposon dans le génome

La conjugaison est utilisée pour l'insertion du transposon mini-Tn5-Tet^R contenant un fragment d'ADN de façon ectopique dans le génome d'une souche d'*E. coli*. On utilise, comme souche donatrice, la souche S17-1λpir contenant le plasmide pUT-mini-Tn5-Tet^R, plasmide mobilisable que l'on va conjuguer dans une souche réceptrice. 200 µL de la souche donatrice est mélangée avec 200 µL de la souche réceptrice et étalée sur boîte 63 sans source de carbone pendant 2 h à 30°C. Les bactéries sont reprises dans 2 mL de milieu 63. 100 µL de cette suspension et 100 µL de la dilution 10⁻¹ sont étalées sur un milieu permettant la sélection de la souche réceptrice ayant intégré ce transposon et la contre-sélection de la donatrice.

V. Techniques de biologie moléculaire

A. Extraction et purification d'ADN

La purification de l'ADN plasmidique est obtenue en utilisant le kit « Nucleospin plasmid » (Macherey Nagel). L'ADN chromosomique est préparé selon la méthode de Davis et coll, 1980.

B. Enzymes de restriction et de modification

Les endonucléases de restriction (New England Biolabs, Takara and Eurogentec) sont utilisées à raison de 3 à 5 U/ μ g d'ADN selon les recommandations des fournisseurs.

Afin de rendre bouts francs certaines digestions, l'ADN polymérase du bactériophage T4 (Biolabs) est utilisée dans le tampon fourni par Biolabs. Pour boucher les extrémités 5' protubérantes, l'activité 5' \rightarrow 3' de polymérisation est réalisée à 12°C en présence de dNTP à 2 mM pendant 15 min. Cette enzyme est désactivée ensuite pendant 10 min à 75°C. Pour les extrémités 3' protubérantes, on privilégiera son activité 3' \rightarrow 5' exonucléasique.

La ligation est réalisée grâce à L'ADN-ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs) dans le tampon fourni la nuit à 4°C.

C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50 μ L à partir de 100 ng d'ADN génomique d'*E. chrysanthemi* ou d'une colonie dans 20 μ L d'eau avec 2,5 unités de l'ADN polymérase Taq (Eppendorf). La PCR est réalisée dans une solution comprenant du tampon eppendorf avec du Mg²⁺, des dNTP à 10 mM et deux amorces à 50 pmol. Le réaction se fait sur 35 cycles avec une minute de dénaturation à 94°C, une minute d'hybridation à différentes températures (de 49 à 58°C) suivant les amorces et une minute à 68°C pour la polymérisation. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 4. Certaines amorces possèdent un site de restriction (souligné dans le tableau 4).

Amorces	Séquence
RcsCfbclprpl5 (NdeI)	5'GAACAAGCATATGAATCAGCGGGAATCGCACCTG3'
RcsCrbclprpl2 (XhoI)	5'GATAATCTCGAGATTGAGCGACATCAGAATTACTTCC3
RcsCfbclprpl3 (BamHI)	5'AACAAGGGATCCAATCAGCGGGAATCGCACCTGCGA3'
RcsCrbclprpl3 (EcoRI)	5'GATAATGAATTCATTGAGCGACATCAGAATTACTTC3'
RcsCfbclprpl4	5'GCGTTCCCGCGGTGCGACAGGCGTGCTGAGGCGGT GC3'
RcsCrbclprpl4	5'CAGCGTCCCGGGAACGCAGCACCGCTAAAAAACGC CG 3'
RcsDfbclprpl1 (NdeI)	5'CTATAACCATATGAACAGCTGGATGACGG3'
RcsDrbclprpl1 (XhoI)	5'CACCCACTCGAGGTTGCGTAGCATGTCGGTCACA3'
RcsDfbclprpl2 (BamHI)	5'CTATAACGGATCCAACAGCTGGATGACGG3'
RcsDrbclprpl3 (EcoRI)	5'CACCCAGAATTCGTTGCGTAGCATGTCGGTCACC3'
RcsDfbclprpl4	5'CGAGATGCTGCAGCAGGCGAACACGCTGGATGAACG3
RcsDrbclprpl4	5'GGGAGAGAAGCTTTCCCGTTCATCCAGCGTGTTTCGC3'
RcsCBPSacIfor (SacI)	5'GAGATATGAGCTCGAATCAGCGGGAATCGCACCTG3'
RcsDBPSacIfor (SacI)	5'GAGATATGAGCTCGAACAGCTGGATGACGGAG3'
PET-29aEcoRIrev (EcoRI)	5'TGTTAGAATTCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTG3'

Tableau 4 : Amorces utilisées. Les sites de restriction sont soulignés et indiqués entre parenthèses après le nom de l'amorce.

D. Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse.

L'analyse des fragments de restriction est réalisée après électrophorèse en gel d'agarose (1 % ou 0,8 %; Q-BIOgene) en présence de bromure d'éthidium (1 µg/mL) et de RNase (4 µg/mL ; sigma), dans du tampon TAE (Tris 200 mM, EDTA 5 mM, ajusté à pH 8,5 par de l'acide acétique glacial).

Les fragments de restriction sont purifiés après migration sur gel à partir du kit Nucleospin extract (Macherey Nagel).

Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le « Smart ladder » de Eurogentec.

E. Séquençage

Tous les inserts amplifiés par PCR sont vérifiés par séquençage des plasmides par la société GenoScreen.

F. Clonage de la boucle périplasmique de RcsC et RcsD pour une expression cytoplasmique

Nous avons réalisé le clonage de la boucle périplasmique de RcsC et de RcsD dans le plasmide pET-29a afin d'avoir une queue polyhistidine en C-terminal et dans le plasmide pGEX-6P afin de fusionner la boucle périplasmique en N-terminal à la Glutathion S-Transférase (GST).

1. Clonages dans pET-29a

Les boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD sont amplifiées par PCR en utilisant respectivement les couples d'amorces RcsCfbclprp15/RcsCrbcprp12 et RcsDfbclprp11/RcsDrbcprp11. RcsD possédant les sites NdeI et XhoI (Tableau 4). Ces produits de PCR sont digérés par les enzymes NdeI et XhoI. Ces deux fragments sont ensuite clonés indépendamment dans le plasmide pET-29a digéré par NdeI et XhoI générant respectivement les plasmides pNFW210 pour la boucle de RcsC et pNFW194 pour la boucle de RcsD.

2. Clonages dans pGEX-6P

Les boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD sont amplifiées par PCR en utilisant respectivement les amorces RcsCfbclprp13/RcsCrbcprp13 et RcsDfbclprp12/RcsDrbcprp13

possédant les sites BamHI et EcoRI (Tableau 4). Ces produits de PCR sont digérés par BamHI et EcoRI. Ces deux fragments sont ensuite clonés indépendamment dans le plasmide PGEX-6P digéré par NdeI et XhoI générant respectivement les plasmides pNFW168 pour la boucle de RcsC et pNFW195 pour la boucle de RcsD.

G. Clonage de RcsF pour une expression périplasmique

Ces clonages ont été réalisées par Carmen Odberg, par remplacement du gène *blaM* du plasmide pXFD11 par le gène *rscF* (sans la séquence signal de RcsF et le premier résidu cystéine) pour obtenir le plasmide pNFW176.

H. Clonage de la boucle périplasmique de RcsC et RcsD pour une expression périplasmique

Ces clonages permettent d'exprimer la boucle périplasmique de RcsC et de RcsD avec une queue histidine dans le périplasma grâce à la présence d'une séquence signal TAT. Pour cela, les fragments des boucles périplasmiques de RcsC et RcsD avec la queue polyhistidine, dans les plasmides précédemment construits pNFW210 et pNFW194, sont amplifiées par PCR en utilisant respectivement les amorces RcsCBPSacIfor/PET-29aEcoRIrev et RcsDBPSacIfor/PET-29aEcoRIrev. Ces fragments de PCR sont digérés par SacI et EcoRI, puis clonés dans le plasmide pXFD11 digéré par SacI et EcoRI générant les plasmides pNFW217, pour la boucle périplasmique de RcsC, et pNFW218, pour la boucle périplasmique de RcsD (Figure 39, page 103).

I. Expression des protéines recombinantes

Les plasmides pNFW210 et pNFW194 sont transformés dans la souche TG1. On obtient respectivement les souches NFB3249 et NFB3233. Les plasmides pNFW168 et pNFW195 sont transformés dans la souche BL21, exprimant l'ARN-polymérase T7. On obtient respectivement les souches NFB3199 et NFB3231.

Les souches sont cultivées en milieu LB contenant en plus 0,2 % de glucose et 0,5 mg/mL d'antibiotique : kanamycine pour les souches NFB3249 et NFB3233, ampicilline pour les souches NFB3199 et NFB3231. A une DO_{620nm} de 0,5, on ajoute de l'IPTG à 0,05 mM pour induire l'expression des protéines recombinantes pendant 3 h ou la nuit soit à 30°C, à 37°C, à 25°C ou à 12°C. Pour obtenir un extrait total de protéines, les cellules sont centrifugées à

10000 g pendant 10 min. Pour séparer la fraction soluble de la fraction insoluble des protéines, les cellules sont centrifugées à 8000 g pendant 10 min et lavées 2 fois avec un tampon PBS modifié (PBS 0,2 M NaCl, 1 % triton X100, 1 mM DTT, 2 mM EDTA et des antiprotéases). Les cellules sont ensuite cassées par deux passages en presse de French à $1,4 \cdot 10^7$ Pascal. Après 10 min de centrifugation à 10000 g, le surnageant est récupéré, il représente la fraction soluble. Le culot est lavé par du PBS modifié puis après une dernière étape de centrifugation, il est récupéré et représente la fraction insoluble. L'extrait soluble, l'extrait insoluble et l'extrait total de protéines sont repris dans du tampon Laemmli puis déposés sur un gel pour une électrophorèse monodimensionnelle.

De même, les plasmides pNFW176, pNFW217 et pNFW218 sont transformés dans la souche JM83. Les souches sont cultivées de la même façon que précédemment en présence de kanamycine et les extraits protéiques sont réalisés de la même façon.

J. Clonage pour l'expression périplasmique des boucles périplasmiques de RcsC ou de RcsD avec RcsF

Les boucles périplasmiques de RcsC et RcsD sont clonés sur le même vecteur que RcsF afin d'exprimer ces boucles périplasmiques fusionnée à une queue polyhistidine dans le périplasme en même temps que l'expression de la partie soluble de RcsF. Pour cloner la boucle périplasmique de RcsC avec RcsF, le plasmide pNFW217 est digéré par FspI et le fragment de 1400 pb est extrait et rendu bouts francs. Ce fragment est ensuite cloné dans le plasmide pNFW176 coupé au niveau du site unique MluI et rendu aussi bouts francs. Le fragment de 1400 pb peut alors s'insérer dans les 2 sens. De même, pour cloner la boucle périplasmique de RcsD avec RcsF, le plasmide pNFW176 est digéré par FspI. Le fragment de 860 pb est extrait et rendu bouts francs. Ce fragment est ensuite cloné dans le plasmide pNFW218 coupé au niveau du site MluI et rendu bouts francs. Le fragment de 860 pb peut s'insérer dans les 2 sens également (Figure 41, page 106).

K. Insertion de *rscF* en monocopie sur le génome d'*E. coli*

Anne-France prouvost a construit le plasmide, pNFW179, pUTminiTn5-TetR contenant le fragment MluI-EcoRI du plasmide pNFW176 dans son site unique SmaI. La souche NFB3211 est une souche S17-1 λ pir d'*E. coli* contenant le plasmide pNFW179. La conjugaison de NFB3211 avec la souche NFB4502 (*opgGH::cml*) est réalisée et nous avons

sélectionné la réceptrice sur milieu LB contenant du chloramphénicol et de la tétracycline. Ceci a pour but d'intégrer le miniTn5-TetR contenant *rscF* d'*E. chrysanthemi* de façon ectopique dans le génome d'*E. coli*.

Résultats

Résultats

I. Analyse protéomique comparative de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* avec différents mutants

Afin de mieux appréhender le rôle des OPG, nous avons réalisé une analyse protéomique comparative des protéines solubles et membranaires du mutant *opgG* (NFB3500) et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* (EC3937). Ces analyses permettent d'avoir une vue sur l'état général de la cellule en absence d'OPG. Nous avons ensuite étudié le protéome d'un mutant *rscC2* (NFB3611) afin de comprendre les répercussions de cette mutation sur l'ensemble du protéome.

A. Analyse protéomique du mutant *opgG*

1. Croissance du mutant *opgG*

Pour réaliser une analyse protéomique comparative, il est indispensable de travailler avec des cellules dans le même état physiologique. Les cellules de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* (EC3937) et du mutant *opgG* (NFB3500) sont cultivées dans les mêmes conditions en LB sans NaCl à 30°C sous agitation. Ces cultures sont ensuite arrêtées à la même densité optique (DO). La croissance des deux souches est similaire (Figure 15). Les cellules sont observées au microscope en présence de gélatine, pour immobiliser les cellules sur la lame, en phase exponentielle (DO_{620nm} de 0,4) (Figure 16). On peut observer une différence de taille entre les cellules de la souche sauvage et du mutant *opgG* suggérant des perturbations dans la division cellulaire. Ces dernières sont plus petites. Nous nous sommes demandés si cette différence de taille ne modifiait pas la lecture de la DO. En phase exponentielle de croissance (DO_{620nm}=0,4), nous avons mesuré la concentration en protéines totales pour les deux souches. La souche sauvage possède une concentration en protéines de 0,12 mg/mL et le mutant *opgG* de 0,11 mg/mL. La concentration en protéines est donc la même pour les 2 souches. L'extraction de protéines a été entreprise à une DO_{620nm} de 0,6.

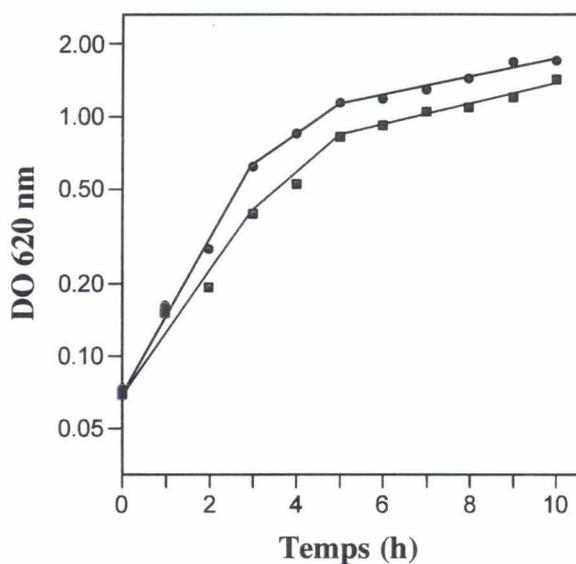


Figure 15 : Croissance en LB sans sel de la souche sauvage (●) et du mutant *opgG* (■) d'*E. chrysanthemi*.

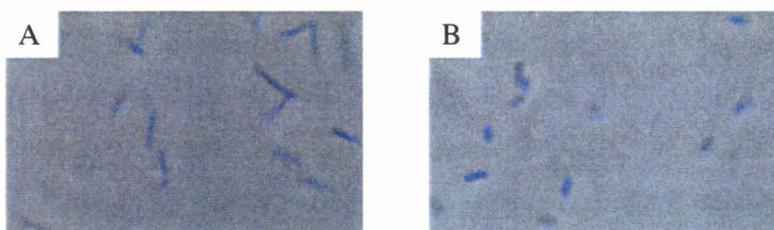


Figure 16 : Observation microscopique à contraste de phase (100x) : A, la souche sauvage et B, le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*.

2. Analyse des protéines membranaires

L'ensemble des phénotypes observés chez un mutant *opgG* suggère une altération de la composition de l'enveloppe ce qui nous a conduit à une analyse des protéines membranaires. Plusieurs mises au point sur l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines membranaires d'*E. chrysanthemi* ont été entreprises mais n'a pas permis de visualiser un nombre significatif de protéines. Puisque cette analyse ne donnait pas de résultats exploitables, nous avons réalisés une électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE 10 %) des protéines membranaires (Figure 17)

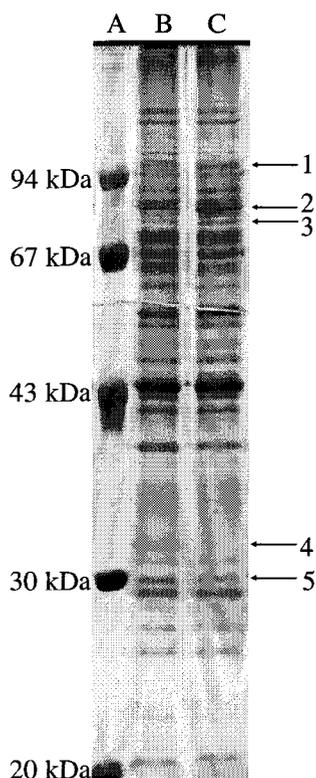


Figure 17 : Gel SDS-PAGE 10 % avec dépôt du marqueur de poids moléculaire (puit A) et des protéines membranaires de la souche sauvage (puit B) et du mutant *opgG* (puit C) d'*E. chrysanthemi*.

n° de spot	n° de CDS	Score Mascot	Masse théorique (kDa)	% de couverture	Gène	Localisation
1	16951	52	105,1	12	<i>sucA</i>	cytoplasmique
2	16141	61	76,3	25	<i>glyS</i>	cytoplasmique
3	16955	55	64,5	20	<i>sdhA</i>	cytoplasmique
4	19735	156	28,9	38	<i>fliC</i>	extracellulaire
5	16902	71	26,1	35	<i>rpsC</i>	cytoplasmique

Tableau 5 : Identification des protéines visuellement différentiellement exprimées chez le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi* par électrophorèse monodimensionnelle après extraction des protéines membranaires.

Les profils de la souche sauvage et du mutant *opgG* sont très proches. Uniquement cinq protéines sont différenciellement exprimées entre les deux souches. Les spots correspondant à ces protéines ont été extraits, digérés par la trypsine puis analysés en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. L’empreinte peptidique massique obtenue a été comparée à la banque d’*E. chrysanthemi* dont nous disposons à l’aide du logiciel Mascot. Aucune des protéines modifiées n’a une localisation membranaire. Il ne nous a pas été possible de détecter des différences au niveau des protéines membranaires. Pour les protéines solubles détectées (SucA, GlyS, SdhA et RpsC), les différences ne sont peut-être pas significatives puisque l’extraction n’était pas destinée à les purifier. D’ailleurs seule SdhA sera retrouvée lors de l’analyse des protéines solubles et FliC dans une analyse de protéines totales. En effet, l’analyse en électrophorèse bidimensionnelle d’un extrait total de protéines de la souche sauvage et du mutant *opgG* montre une sous-expression de FliC et de FlgE (Figure 18). La polymérisation de la protéine FlgE forme la structure du crochet alors que la protéine FliC (flagelline) est la sous-unité de base qui en se polymérisant forme le filament du flagelle. Le crochet et le filament sont deux composants majeurs du flagelle.

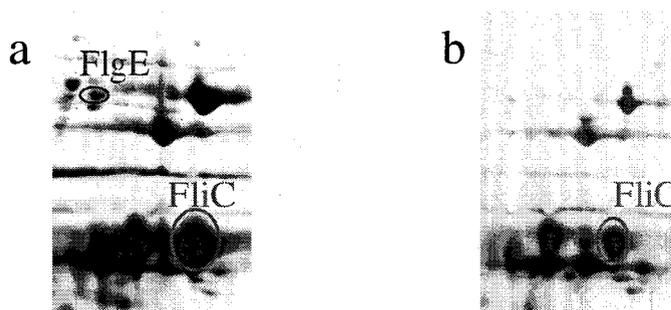


Figure 18 : Une partie d’un gel d’électrophorèse bidimensionnelle de protéines totales de la souche sauvage (a) et du mutant *opgG* (b) d’*E. chrysanthemi* cultivés en milieu LB.

L’un des phénotype du mutant *opgG* d’*E. chrysanthemi* est une forte réduction de sa motilité comparé à la souche sauvage. Ce défaut de motilité est donc certainement dû à un défaut de synthèse de protéines du flagelle, comme l’avaient déjà montré Fiedler et Rotering en 1988 chez un mutant *opgH* d’*E. coli* K12.

3. Analyse des protéines solubles

Nous nous sommes alors focalisés sur les modifications d'expression des protéines solubles d'une souche *opgG* comparée à une souche sauvage d'*E. chrysanthemi*. Les protéines solubles extraites de ces deux souches sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle avec dans une première dimension, une séparation des protéines suivant leur point isoélectrique (pI) et dans une seconde dimension en fonction de leur poids moléculaire. Pour la première dimension, nous avons utilisé des gels dont le gradient de pH est compris entre 3 et 10. Les gels obtenus sont colorés au nitrate d'argent (Figure 19). La majorité de spots observés sont localisés dans une gamme de pI comprise entre 4,6 et 6,6. Les gels sont ensuite soumis à une analyse informatique par le logiciel « ImageMaster 2D platinum software V » (ou Melanie V) en utilisant trois gels pour chaque condition. Cette analyse a permis d'établir deux gels synthétiques avec 275 et 218 spots respectivement pour la souche sauvage et le mutant *opgG*. 55 spots dont l'intensité est différente entre les 2 souches sont excisés du gel et les polypeptides sont identifiés à partir de l'empreinte peptidique massique obtenue par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Pour tous les polypeptides identifiés, la masse et le pI obtenus des gels 2D correspondent bien à la masse et au pI théorique de la protéine identifiée. Nous avons pu attribuer une fonction à 51 des 55 spots polypeptidiques extraits (Tableau 6). La majorité des protéines sont cytoplasmiques (43) et 8 sont périplasmiques. On peut classer les protéines dont l'expression varie en onze catégories. D'une manière plus simplifiée, les protéines sont classées en cinq principales catégories avec des fonctions distinctes : le métabolisme, l'enveloppe, la conformation et la dégradation des protéines, les fonctions inconnues et les autres fonctions (Figure 20). Environ la moitié (25) sont des protéines intervenant dans la conformation et la dégradation des protéines et dans le métabolisme des sucres. Nous nous sommes focalisés sur les protéines dont le niveau d'expression entre les deux souches varie au minimum d'un facteur deux. Parmi celles-ci, seulement trois protéines présentent une expression diminuée chez le mutant *opgG*. En effet, la majorité des protéines différenciellement exprimées sont surexprimées chez le mutant *opgG* par rapport à la souche sauvage.

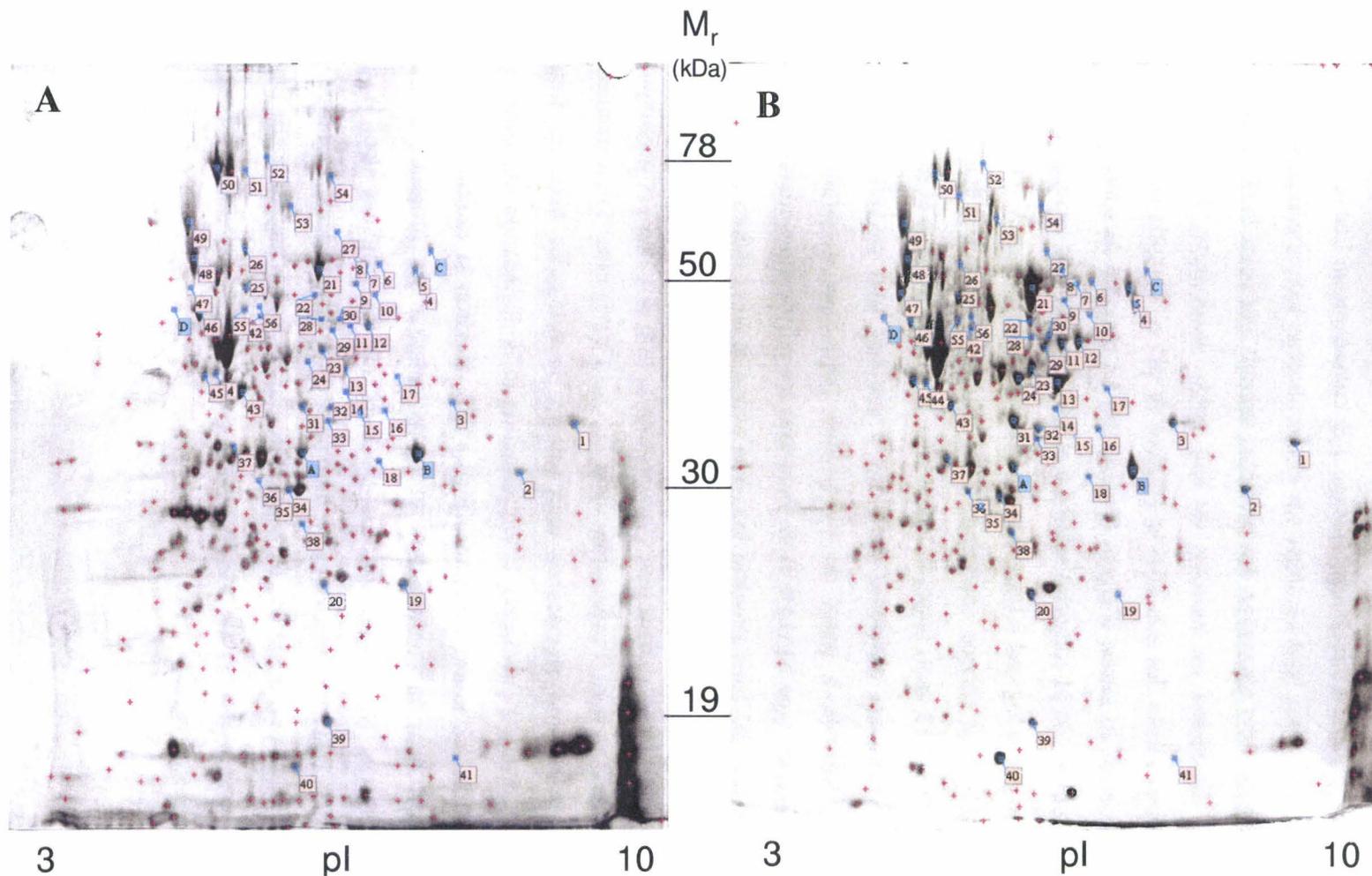


Figure 19 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines solubles de la souche sauvage (A) et du mutant *opgG* (B) d'*E. chrysanthemi*. Les gels sont colorés au nitrate d'argent. Les croix rouges représentent l'ensemble des spots mis en évidence par un logiciel d'analyse des gels 2D. Les lettres représentent les spots utilisés pour le calibrage des gels et les chiffres, les protéines identifiées dont l'expression varie entre les deux souches (facteur deux au minimum).

n° du spot ^a	n° CDS ^b	pI	Masse ^b (kDa)	Gène ^b	Localisation	Ratio ^c	Fonction putative ^b	% de couverture	Score ^d	Nombre de peptides ^e
Synthèse des polysaccharides										
25	15220	5.4	51.2	<i>cpsG</i>	cytoplasmique	2.3	phosphomannomutase	22	67	10
18	15224	6.2	35	<i>fcl</i>	cytoplasmique	1.6	GDP-L-fucose-synthétase	27	52	7
33	20562	5.9	36.9	<i>galE</i>	cytoplasmique	2.8	UDP-glucose-4-épimérase	25	68	7
32	19489	5.8	32.3	<i>galF</i>	cytoplasmique	3	glucose-1P-uridylyl transférase	39	89	10
37	20647	5.2	33.4	<i>galU</i>	cytoplasmique	8.3	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase	30	56	8
24	20463	5.7	39.8	<i>rffG</i>	cytoplasmique	5.1	dTDP-glucose-4,6-déshydratase	31	86	9
23/28	19487	5.8	43.4	<i>ugd</i>	cytoplasmique	5	UDP-glucose déshydrogénase	21/54	65/282	6/22
Régulation										
51	16313	5.2	67.5	<i>bipA</i>	cytoplasmique	1.5	GTPase fixant le ribosome	29	77	16
Détoxification										
20	17551	5.8	22.4	<i>no name</i>	cytoplasmique	1.9	alkyl hydroperoxyde réductase	32	63	7
Métabolisme des acides aminés										
11	18183	6.1	45.3	<i>glyA</i>	cytoplasmique	4.5	sérine hydroxyméthyl transférase	29	66	14
Métabolisme des lipides										
4	17046	6.7	49.3	<i>accC</i>	cytoplasmique	2.2	biotine carboxylase	27	51	14
39	19707	5.9	19.1	<i>fabA</i>	cytoplasmique	0.58	β-hydroxydécanoyl thioester déshydratase	27	69	5
35	19259	5.4	28.2	<i>fabI</i>	cytoplasmique	0.47	énoyl-ACP réductase	27	85	7
Métabolisme des nucléotides										
22	15203	5.8	47.3	<i>purA</i>	cytoplasmique	4.4	adénylosuccinate synthase	18	75	11

30	17763	5.9	51.5	<i>purB</i>	cytoplasmique	8.3	adénylosuccinate lyase	38	173	19
Métabolisme des sucres										
52	19243	5.5	99.2	<i>aceE</i>	cytoplasmique	1.1	sous-unité de la pyruvate déshydrogénase	26	124	20
31	15181	5.6	39.1	<i>fbaA</i>	cytoplasmique	4.7	fructose-bisphosphate aldolase de classe II	20	50	7
13	18196	6.6	44.4	<i>ganA</i>	périplasmique	4.4	endogalactanase	34	95	15
5	15062	6.5	56.7	<i>glpD</i>	cytoplasmique	5	glycérol 3-phosphate déshydrogénase	38	174	25
21	20398	5.8	56	<i>glpK</i>	cytoplasmique	3.3	glycérol kinase	29	223	17
14	15029	6.1	40.8	<i>glpQ</i>	cytoplasmique	2.8	glycérophosphoryl diester phosphodiesterase	50	96	18
12	16958	6.2	48.1	<i>gltA</i>	cytoplasmique	2.6	citrate synthase	18	67	9
55	46981	5.3	51.5	<i>gnd</i>	cytoplasmique	1.9	6-phosphogluconate déshydrogénase	23	55	10
38	20551	5.7	28.6	<i>gpmA</i>	cytoplasmique	2.9	phosphoglycéro-mutase 1	22	53	6
27	17827	5.9	61.2	<i>pgi</i>	cytoplasmique	5.6	phosphoglucose isomérase	30	61	13
50	19893	5.1	87.2	<i>ppsA</i>	cytoplasmique	0.59	phosphoenolpyruvate synthase	22	86	15
53	16955	5.7	64.5	<i>sdhA</i>	cytoplasmique	3.9	succinate déshydrogénase	26	114	17
26	20198	5.3	62.9	<i>sfcA</i>	cytoplasmique	0.42	néoglucogénèse malate déshydrogénase (enzyme malique)	26	101	13
54	15185	5.9	71.9	<i>tktA</i>	cytoplasmique	4.2	transcétolase 1 isoenzyme	21	107	14
43	20276	5.3	40	<i>yiaY</i>	cytoplasmique	0.3	alcool déshydrogénase	54	66	19
Conformation et dégradation des protéines										
42	19559	5.4	46.7	<i>clpX</i>	cytoplasmique	3	sous-unité de la protéase ClpXP	32	116	12
10	15693	7.7	47.9	<i>degQ</i>	périplasmique	2.7	sérine endoprotéase	34	181	15

36/56	15461	6.1	29.9	<i>fkpA</i>	périplasmique	— ^f	protéine chaperon FKPB	37/39	67/93	12/13
48	18669	4.9	57.5	<i>groL</i>	cytoplasmique	1.2	sous-unité GroEL de la protéine chaperon GroES/GroEL	57	118	40
40	18667	5.7	10.5	<i>groS</i>	cytoplasmique	2.7	sous-unité GroES de la protéine chaperon GroES/GroEL	55	71	5
6	16590	6.4	54.8	<i>pepA</i>	cytoplasmique	4.9	aminopeptidase	17	55	9
29	20133	5.9	46.9	<i>pepB</i>	cytoplasmique	8.4	aminopeptidase	37	154	18
9	17747	6.1	50.4	<i>pepQ</i>	cytoplasmique	0.77	proline dipeptidase	18	53	7
47	20523	4.9	48.2	<i>tig</i>	cytoplasmique	3.4	chaperone "trigger factor"	62	74	34
Transport										
46	14785	5	50.3	<i>atpD</i>	cytoplasmique	0.7	sous-unité β de l'ATP synthase	37	76	11
2	18320	8.6	34.1	<i>gltI</i>	périplasmique	1.8	protéine affine du glutamate	61	149	21
34	18377	6.5	35.8	<i>mglB</i>	périplasmique	2.4	protéine affine du galactose	56	134	16
8	20639	6.4	61.3	<i>oppA</i>	périplasmique	3	protéine affine des oligopeptides	38	105	22
16	19819	7.6	41	<i>potF</i>	périplasmique	1.5	protéine affine de la putrescine	22	59	8
3	20233	8.8	36.8	<i>inconnu</i>	périplasmique	2.9	protéine affine du fer	30	61	11
Transcription										
44/45	16922	5	36.6	<i>rpoA</i>	cytoplasmique	2	sous-unité α de l'ARN polymérase	38/40	75/59	11/17
Traduction										
49	46566	4.9	61.3	<i>rpsA</i>	cytoplasmique	1.6	protéine S1 de la sous-unité 30S du ribosome	55	210	29
15	20829	6.1	37.7	<i>trpS</i>	cytoplasmique	2.5	tryptophane ARNt synthétase	21	102	10
Fonction inconnue										
17	15570	7.8	45.5	<i>ydgJ</i>	inconnu	3.5	inconnue	25	108	10
41	15573	8.5	17.1	<i>inconnu</i>	inconnu	9.1	inconnue	48	103	8

7	47171	6.3	50.7	<i>inconnu</i>	inconnu	2.9	inconnue	18	65	10
19	47181	6.6	25.6	<i>inconnu</i>	inconnu	0.42	inconnue	42	69	9

Tableau 6 : Identification des protéines solubles différentiellement exprimées chez le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*. ^ale numéro des spots correspond aux protéines de la Figure 19. ^bdonnées de la banque d'*E. chrysanthemi* (<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm>). ^cintensité du spot pour chaque protéine du mutant *opgG* par rapport à la même protéine de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi*. ^dle score correspond à $(-10)\log P$ où P est la probabilité d'observer un recouvrement au hasard. ^enombre de peptides utilisables pour l'identification de la protéine. ^fla protéine FkpA est retrouvée uniquement chez le mutant *opgG*.

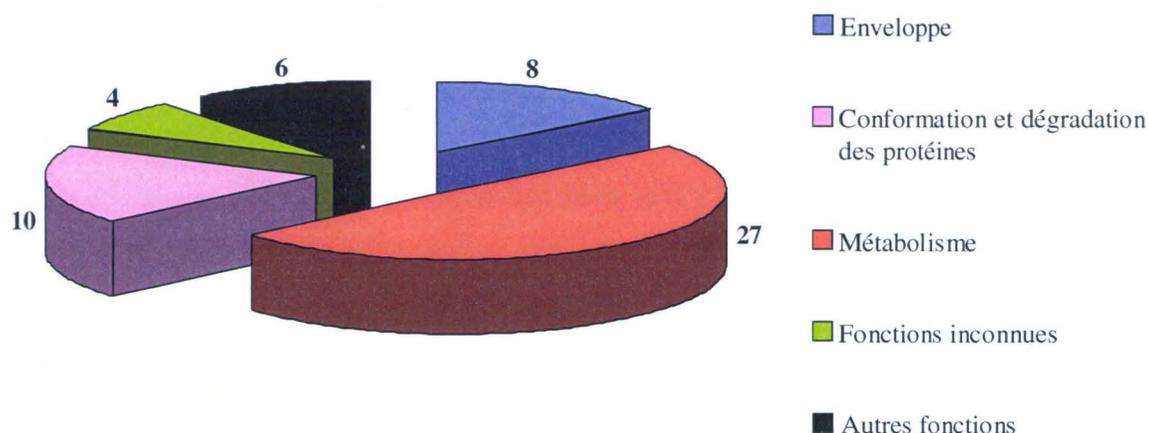


Figure 20 : Représentation des cinq principales catégories de protéines solubles modifiées chez le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*. Le chiffre représente le nombre de protéines identifiées dans chacune des catégories.

a. L'enveloppe

Nous avons pu identifier cinq protéines surexprimées qui participent à la biosynthèse des exopolysaccharides. La première est L'UDP-glucose déshydratase (Ugd), qui participe également, chez *Salmonella enterica* et *Yersinia pestis* à une modification du LPS, permettant une résistance accrue aux peptides antimicrobiens (Mousslim et Groisman, 2003 ; Winfield et coll., 2005). Ensuite nous retrouvons la phosphomannomutase (CpsG), protéine spécifique de la biosynthèse de ces exopolysaccharides, les deux sous-unités de l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase (GalU/GalF) et l'UDP-glucose-4-épimérase (GalE). Les protéines GalU et GalF catalysent la réaction réversible de l'UTP et du glucose-1-phosphate en UDP-glucose. GalU, GalF et GalE interviennent dans la synthèse de plusieurs polysaccharides mais aussi dans d'autres métabolismes comme celui du galactose (Keseler et coll., 2005). La surexpression de ces cinq protéines intervenant dans la biosynthèse des exopolysaccharides est en concordance avec le phénotype muqueux, indiquant une surexpression des exopolysaccharides, observé chez le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*. Ces résultats sont renforcés par la surexpression d'un facteur 3 d'une fusion *cpsB::lacZ* dans un contexte *opgG* (Franck Bouchart, 2006), CpsB étant nécessaire à la synthèse des exopolysaccharides.

La protéine RffG est surexprimée. Cette protéine est une dTDP-glucose-4,6-déshydratase nécessaire, avec les protéines GalU/GalF et GalE, à la synthèse de l'antigène commun des

entérobactéries (ECA) et de l'antigène O du LPS. Cette surexpression indique une modification de la structure des polysaccharides liés à la membrane et/ou une augmentation de la partie glycanique de ces molécules. Ces conclusions ont été renforcées par une étude comparative des glycoconjugués bactériens qui révèle une augmentation significative des monosaccharides constituant le LPS chez le mutant *opgG* par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi*. En effet, cette analyse révèle une augmentation de 1,5 fois chez le mutant *opgG* du niveau du KDO (l'acide céto-désoxyoctanoïque), spécifique du LPS et du niveau de la N-acétylglucosamine, constituant du Lipide A du LPS tandis que le niveau du peptidoglycane reste stable (Bohin et coll., 2005).

L'acétyl CoA carboxylase (AccC) participant à la première étape de biosynthèse des acides gras est surexprimée. Cette enzyme serait l'étape limitante de cette biosynthèse (Davis et coll., 2000). De plus, la synthèse de l'énoyl-ACP réductase (FabI) impliquée dans la biosynthèse des acides gras insaturés est diminuée. La réduction de cette enzyme indique une augmentation de la saturation des acides gras et donc une baisse de la fluidité membranaire (Keseler et coll., 2005) chez le mutant *opgG*. L'augmentation du degré de saturation des acides gras chez le mutant *opgG* avait déjà été montré lors de l'analyse de la composition des phospholipides. En effet, le mutant *opgG* montre une réduction de 20 à 30 % de la quantité des acides gras saturés C16:1 et C18:1 des phospholipides membranaires comparée à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* (Bohin et coll., 2005). De plus, trois enzymes impliquées dans le catabolisme du glycérol (GlpD, GlpQ et GlpK) sont augmentées.

Chez les mutants *opgG*, la composition de l'enveloppe est fortement altérée. Nous observons une modification à la fois au niveau de la structure et de la quantité des composants de l'enveloppe, que ce soit au niveau polysaccharidique ou phospholipidique. Ces réarrangements conduisent à une augmentation de la rigidité des membranes, nécessaire pour que le mutant *opgG* puisse combler l'absence d'OPG au niveau de l'enveloppe.

La division cellulaire est également perturbée chez le mutant *opgG*. Chez ce dernier, 2 protéines de la division cellulaire sont surexprimées. Tout d'abord, nous avons la protéine PepA. PepA est une peptidase mais aussi une protéine impliquée dans la recombinaison spécifique de site Xer nécessaire lors de la ségrégation de certains chromosomes fils liés covalamment durant la réplication (Mc Culloch et coll., 1994). Nous ne sommes pas capable de dire si l'augmentation de PepA est liée uniquement à la nécessité du mutant *opgG* d'augmenter son activité peptidase ou si elle est liée à des problèmes de division cellulaire.

b. Le métabolisme

Nous avons retrouvé plusieurs protéines impliquées dans des systèmes de transport de nutriments. Nous ne pouvons détecter, *a priori*, que des systèmes de transport de type ABC car ils sont les seuls à posséder une protéine soluble. MglB est une protéine affine périplasmique nécessaire au transport du galactose (Keseler et coll., 2005) alors que OppA est nécessaire à la nutrition par les peptides et au recyclage des muopeptides (Monnet, 2003). De plus, la synthèse d'une galactanase périplasmique (GanA) est augmentée. Le gène codant cette enzyme appartient à un locus contrôlant le transport des galactanes (Delangle et coll., en révision à « Journal of bacteriology »). Ainsi chez le mutant *opgG*, les systèmes de transport semblent être stimulés. Les protéines MglB et OppA sont retrouvées surexprimées également chez *E. coli* en anaérobiose et lorsque le pH est élevé (Yohannes et coll., 2004). De plus, ces protéines pourraient jouer, en plus de leur rôle dans le transport, un rôle dans la conformation des protéines. Ces protéines pourraient participer à la protection des protéines dans le périplasma lors d'un stress (Richarme et Caldas, 1997).

L'expression de nombreuses enzymes du métabolisme des sucres est modifiée chez le mutant *opgG* (Figure 21). On observe une augmentation du flux des sucres vers la glycolyse et une baisse de la néoglucogénèse chez le mutant *opgG*. Le catabolisme des sucres est augmenté. Une seule enzyme, l'enzyme malique (SfcA), est sousexprimée chez le mutant *opgG*. SfcA permet de catalyser la transformation du malate en pyruvate et donc réduit une des deux voies possibles de la néoglucogénèse (Romeo et Snoep, 2005). Parmi les enzymes surexprimées chez le mutant *opgG*, trois sont des enzymes de la glycolyse (Keseler et coll., 2005). La phosphoglucose isomérase (Pgi) catalyse la première étape de la dégradation du glucose. La fructose biphosphate aldolase majeure (FbaA) est utilisée à 95 % dans le sens de la glycolyse et n'est pas indispensable pour la néoglucogénèse chez *E. coli* (Romeo et coll., 2005). La phosphoglycérate mutase (GpmA) catalyse une des dernières étapes conduisant au pyruvate. La synthèse de GpmA est augmentée chez d'autres espèces bactériennes soumises à divers stress environnementaux (Sanchez et coll., 2005). De plus, huit enzymes alimentant à différents endroits la glycolyse sont surexprimées. Parmi celles-ci, trois (GlpD, GlpQ et GlpK) sont impliquées dans le catabolisme du glycérol en dihydroxyacétone phosphate. Trois autres (GalU, GalF et GalE) sont impliquées à la fois dans la synthèse de polysaccharides (LPS, exopolysaccharides et ECA) et dans le catabolisme du galactose. Si la surexpression de ces trois protéines est indispensable à la surproduction des polysaccharides, nous ne pouvons pas affirmer que cette surexpression est utilisée chez le mutant *opgG* pour alimenter la glycolyse.

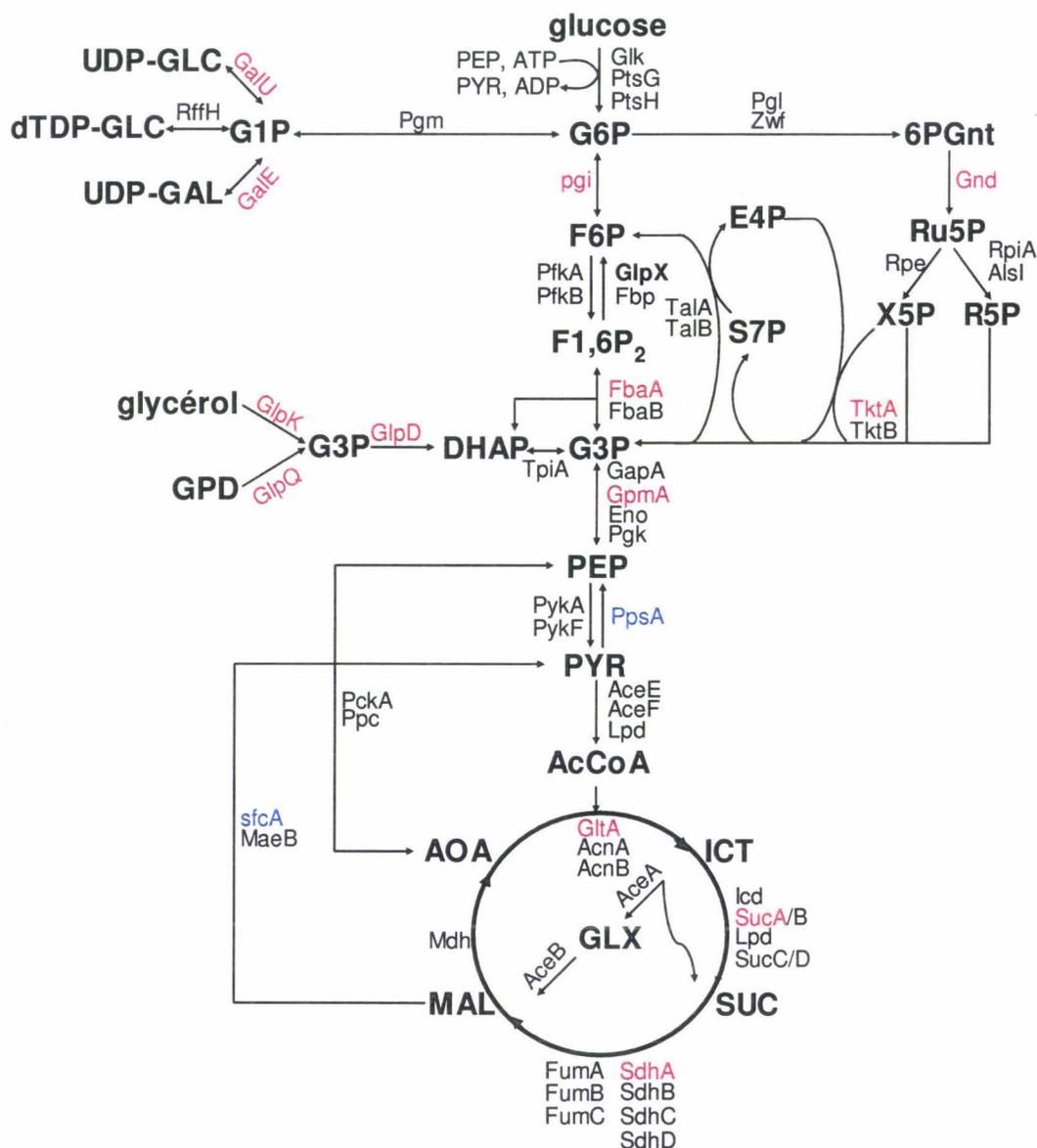


Figure 21 : Localisation des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres dont l'expression est altérée chez le mutant *opgG* d'*E. chrysanthemi*. En rouge sont représentées les protéines surexprimées et en bleu, les sousexprimées chez le mutant *opgG*.

Les 2 dernières, la 6-phosphogluconate déshydrogénase (Gnd) et la transcétolase majeure (TktA), sont deux enzymes de la voie des pentoses. Chez *E. coli*, la transcétolase est l'enzyme clé qui régule le flux entre la voie des pentoses et la glycolyse. Elle est essentielle pour le catabolisme des pentoses (Romeo et coll., 2005). Sa surproduction augmente la synthèse du glyceraldéhyde-3-phosphate et du fructose-6-phosphate, deux intermédiaires de la glycolyse. De plus, la transcétolase est surexprimée lors du stress provoqué par les sels biliaires chez *Bifidobacterium longum* (Sanchez et coll., 2005) et jouerait un rôle dans la protection contre le stress oxydatif chez *Saccharomyces cerevisiae* (Slekar et coll., 1996). Donc le flux glycolytique est augmenté chez un mutant *opgG*. Ensuite deux enzymes du cycle de Krebs, la citrate synthase (GltA) et la succinate déshydrogénase (SdhA) sont surexprimées chez le mutant *opgG*. La surexpression de SdhA suggère que le cycle soit fermé et donc qu'il fonctionne à la fois pour fournir des précurseurs métaboliques mais aussi pour produire de l'énergie. En effet, chez *E. coli*, en aérobiose, le cycle de Krebs n'est pas fermé puisqu'il s'arrête au succinate. Il est donc presque uniquement consacré à la synthèse de précurseurs (Romeo et Snoep, 2005). L'augmentation de ces trois enzymes du cycle de Krebs indique une augmentation des besoins en énergie du mutant. Chez *E. coli*, une augmentation du besoin en énergie due à l'induction par la température de la synthèse de protéines recombinantes provoque une augmentation de la respiration et une surproduction de la succinate déshydrogénase (Hoffmann et coll., 2002). En absence d'OPG, les bactéries ont un métabolisme énergétique augmenté. Or, ce besoin accru en énergie est fréquemment retrouvé lorsque les bactéries sont en état de stress indiquant que l'augmentation du catabolisme fait partie de la réponse au stress.

c. La mise en conformation et la dégradation des protéines

Il est maintenant bien démontré que la réponse à un stress s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des trois classes de protéines : les chaperons, les protéases et les peptidases. Or chez le mutant *opgG*, sept protéines gouvernant la mise en conformation et la dégradation des protéines sont surexprimées (Tableau 6). Parmi celles-ci, on retrouve trois chaperons, l'un périplasmique, FkpA détecté uniquement chez le mutant et les deux autres cytoplasmiques, Tig et GroEL/GroES. Dans le cas de GroEL/GroES, seule la sous-unité GroES est significativement surexprimée. Ces trois chaperons participent à la mise en conformation des protéines néosynthétisées. Le facteur Tig est lié au ribosome et fonctionne en association avec DnaK pour la mise en conformation et l'adressage des protéines (Deuerling et coll., 1999). La

protéine FkpA possède une activité de cis-transprolyl isomérase (Justice et coll., 2005). Chez *E. coli*, le gène *fkpA* est activé par le facteur σ^E . Le facteur σ^E est un facteur sigma alternatif induit par l'augmentation de protéines mal conformées dans le périplasma causée par des conditions de stress affectant l'intégrité de l'enveloppe. Ce facteur est également nécessaire à la virulence (Dartigalongue et coll., 2001). FkpA est impliquée dans la réponse aux chocs thermiques et participe à la survie intracellulaire de *Salmonella typhimurium* (Horne et coll., 1997). Chez *Legionella pneumophila*, cette même survie intracellulaire dépend de la présence de la protéine Mip, une protéine de type FkpA (Cianciotto et coll., 1990). Une endoprotéase périplasmique DegQ et deux peptidases cytoplasmiques, PepA (déjà citée plus haut) et PepB sont surexprimées. DegQ dégrade les protéines dénaturées ou mal conformées qui sont produites dans des conditions normales de croissance ou qui sont accumulées après diverses conditions de stress (Yohannes et coll., 2004 ; Kolmar et coll., 1996). En plus de son activité peptidase, PepA est impliquée dans la régulation de facteurs de virulence chez *Vibrio cholerae* (Behari et coll., 2001). Pour la protéase cytoplasmique ClpXP, nous avons détecté uniquement la surexpression de la sous-unité ClpX, ceci ne nous permet donc pas d'affirmer que cette protéase est surexprimée. Cependant les gènes *clpP* et *clpX* sont sous le contrôle d'un même promoteur et le gène *clpP* est le premier gène de cet opéron suggérant fortement la surproduction de la protéase ClpPX. Les protéines affines périplasmiques de système de transport de type ABC, MglB et OppA, citées précédemment, possèderaient une deuxième activité de type chaperon et participeraient à la protection contre le stress dans le périplasma (Richarme et Caldas, 1997). Puisque ces protéines possèdent deux fonctions distinctes, nous ne pouvons pas savoir si la surexpression est nécessaire pour augmenter le transport, pour participer à la stabilisation de la structure des protéines ou pour les deux.

L'ensemble de ces résultats indique que le mutant *opgG* chez *E. chrysanthemi* répond à l'absence d'OPG par une surexpression de plusieurs protéines impliquées dans la réponse au stress.

d. Les autres fonctions

Dans cette catégorie, nous plaçons quelques protéines dont l'expression est modifiée et dont il est difficile de trouver une explication même si elles sont observées chez d'autres bactéries dans des conditions de stress ou impliquées dans la virulence. La protéine RpoA, sous-unité α de l'ARN-polymérase est également retrouvée surexprimée chez le mutant *opgG*. Cette protéine est connue pour interagir avec certains régulateurs. Elle est surexprimée chez

Chlamydia pneumoniae lors de l'infection et chez *Bifidobacterium longum* lors de l'exposition aux sels biliaires (Sanchez et coll., 2005 ; Molestina et coll., 2002). On peut noter la surexpression de protéines intervenant dans la traduction comme TrpS, la synthétase de L'ARNt-tryptophane mais aussi, sur l'analyse des protéines membranaires, GlyS, la synthétase de la ARNt-glycine. Nous avons une surexpression de PurA, PurB et GlyA, enzymes impliquées dans la synthèse des purines. GlyA est une enzyme clé de la biosynthèse des purines mais également de la thymidine et de la biosynthèse des acides aminés tels que la glycine, la méthionine et la sérine (Keseler et coll., 2005). La surexpression de membres de ces familles de protéines a été observée durant l'exposition de *B. longum* aux sels biliaires (Sanchez et coll., 2005). De plus l'expression de gènes de la biosynthèse des acides aminés et des bases nucléotidiques est modifiée chez *S. enterica* durant la phase de développement intracellulaire de l'infection des macrophages (Eriksson et coll., 2003).

Par cette analyse protéomique, nous avons pu réaliser une étude globale du protéome des mutants *opgG*. Malgré le caractère non exhaustif de cette analyse, ces résultats ont permis, en confirmant les phénotypes de mucosité et de motilité déjà décrits comme altérés chez le mutant, de valider cette approche protéomique. De plus, cette analyse a révélé de nouveaux phénotypes qu'il nous aurait été difficile de mettre en évidence par une autre approche.

B. Analyse protéomique du mutant *rscC2*

1. La croissance du mutant *rscC2*

Pour réaliser l'étude des protéines solubles du mutant *rscC2* (NFB3611), nous avons utilisé les mêmes conditions de croissance que celles utilisées lors de l'analyse du mutant *opgG*, c'est-à-dire en LB sans NaCl en phase exponentielle de croissance. Le mutant *rscC2* présente une croissance similaire à la souche sauvage et au mutant *opgG*.

2. Analyse des protéines solubles

Nous avons procédé exactement de la même façon que précédemment afin de pouvoir comparer le protéome de la souche *rscC2* au protéome de la souche sauvage et du mutant *opgG*. Nous avons ensuite réalisé une analyse informatique par le logiciel « ImageMaster 2D platinum software V ». Le gel synthétique obtenu à partir de trois gels de mutant *rscC2*

contient 184 spots (Figure 22). Nous pouvons constater que ce mutant possède moins de protéines comparé à la souche sauvage (275 spots) et au mutant *opg* (218 spots). Nous avons comparé les 55 spots déjà identifiés lors de l'analyse précédente. Ces protéines identifiées sont classées dans le tableau 7. 33 protéines varient au minimum d'un facteur deux chez le mutant *rcsC2* par rapport à la souche sauvage.

a. L'enveloppe

Au niveau de l'enveloppe, on peut constater que les protéines impliquées dans la synthèse des exopolysaccharides ont une expression proche de celle observée chez la souche sauvage. Ceci est en accord avec les phénotypes observés chez le mutant *rcsC2*. La souche n'est pas muqueuse comme la souche sauvage. De plus, Franck Bouchart a montré que l'activité β -galactosidase de la fusion *cpsB::lacZ* est identique dans un contexte sauvage ou dans un contexte *rcsC2* alors que cette activité est trois fois plus importante dans le contexte *opgG*. On peut constater que la protéine GalU n'est pas détectée chez le mutant *rcsC2*. Cette protéine est indispensable, entre autres, à la synthèse des OPG. La faible quantité de GalU pourrait être corrélée à la baisse de la quantité d'OPG observée chez le mutant *rcsC2*. En effet, le mutant *rcsC2* présente deux fois moins d'OPG que la souche sauvage (Bouchart, 2006).

Une diminution de la β -hydroxydécanoïl thioester déshydratase (FabA) est observée chez la souche *rcsC2* comme chez le mutant *opgG*. Cette protéine est impliquée dans la biosynthèse des acides gras insaturés. Le mutant *rcsC2* semble avoir une augmentation de la saturation des acides gras et donc une baisse de la fluidité membranaire (Keseler et coll., 2005) comme chez le mutant *opgG*. L'enveloppe du suppresseur reste perturbée à cause d'une rigidité des membranes augmentée mais nous ne pouvons pas mesurer l'ampleur de cette perturbation. Il est peu probable que cette variation soit due à la diminution d'environ 50 % de la quantité d'OPG chez ce mutant puisque cette baisse correspond à celle observée lorsque la bactérie est en milieu LB.

b. Le métabolisme

Deux protéines spécifiques de la néoglucogénèse sont surexprimées chez le mutant *rcsC2*. Il s'agit de SfcA, l'enzyme malique et de PpsA, la phosphoénolpyruvate synthase. SfcA permet de synthétiser du pyruvate à partir du malate et la PpsA permet de synthétiser du phosphoénolpyruvate (PEP) à partir du pyruvate. La synthèse du PEP est la première étape de la néoglucogénèse chez les bactéries (Hansen et Juni, 1975). La voie utilisant PpsA représente

une des 2 routes possibles pour la synthèse du PEP. La seconde route nécessite l'enzyme PckA, la pyruvate décarboxylase et synthétise du PEP à partir de l'acide oxaloacétique (Osteras et coll., 1997). Deux autres enzymes, GpmA et FbaA, pouvant être impliquées à la fois dans la glycolyse et dans la néoglucogenèse, ont une expression modifiée chez ce mutant. Mais la surexpression des deux enzymes spécifiques de la néoglucogenèse indique que la néoglucogenèse est augmentée chez le mutant *rscC2*. On peut supposer que la surexpression de SfcA et PpsA est liée à une accumulation de malate, un des principaux précurseur de la néoglucogenèse. Le malate est un composé abondant chez les végétaux (Gout et coll., 1993). *E. chrysanthemi* possède 3 systèmes de transport putatif du malate (Bohin, communication personnelle). La néoglucogenèse a été montrée comme nécessaire pour la virulence de *Mycobacterium bovis*, pathogène pour les animaux (Collins et coll., 2002) et de *Xanthomonas campestris*, phytopathogène notamment du *Saintpaulia ionantha* (Tang et coll., 2005). La surexpression de protéines de cette voie pourrait être liée à l'hypervirulence observée chez ce mutant.

Chez le mutant *rscC2*, au niveau du cycle de Krebs, la protéine SdhA, la succinate déshydrogénase, est sous-exprimée. Ainsi le cycle ne semble pas fermé pour synthétiser des précurseurs. Lors de la croissance d'une souche d'*E. coli* sur malate comme seule source de carbone chez *E. coli*, le cycle de Krebs est ouvert. De plus, l'accumulation de malate est suivie par une accumulation de PEP (Neidhardt et coll., 1993). Chez ce mutant, le métabolisme semble plutôt diriger vers de l'anabolisme avec un cycle de Krebs ouvert et une néoglucogenèse accrue.

Au niveau de la voie des pentoses phosphate, une seule protéine est fortement surexprimée : Gnd, la 6-phosphogluconate déshydrogénase. On peut donc pas en déduire que cette voie est surexprimée chez le mutant *rscC2*.

c. La mise en conformation et la dégradation des protéines

Le mutant *rscC2* possède une surexpression de certaines protéines impliquées dans la dégradation de protéines (DegQ, PepA et PepB) et dans la mise en conformation (Tig et FkpA). Ce qui semble indiquer que cette souche répond à la mutation *rscC2* par la surexpression de plusieurs protéines impliquées dans la réponse au stress.

d. Les autres fonctions

Une GTPase, BipA, est sousexprimée chez le mutant *rscC2*. Cette protéine est largement distribuée chez les bactéries et les plantes. Elle régule des composants associés à la surface cellulaire et à la virulence d'une souche d'*E. coli* entéropathogène (Grant et coll., 2003). De plus chez *Bordetella pertussis*, BipA joue un rôle dans l'adhérence et dans la spécificité d'hôte et elle est contrôlée par le système à deux composants, BvgA/BvgS (Farris et coll., 1998). On peut supposer que la dérégulation de cette protéine peut avoir un impact à fois sur la virulence et sur la motilité. On peut noter la surexpression de protéines intervenant dans la transcription (RpoA), dans la traduction (TrpS). Deux protéines du métabolisme des nucléotides (PurA et DeoC) sont sousexprimées chez le mutant *rscC2*, la première est impliquée dans l'anabolisme de l'AMP et la seconde dans le catabolisme des déoxyribonucléotides. Il est donc difficile de comprendre dans quel sens varie le métabolisme des nucléotides. De même pour les protéines impliquées dans des systèmes de transport, on peut observer que la protéine OppA est retrouvée sousexprimée alors que les protéines MglB et PotF sont surexprimées. La protéine GanA est au même niveau que la souche sauvage.

L'analyse protéomique du mutant *rscC2* nous avait paru important en raison de son hypervirulence. Cependant l'ampleur des modifications est relativement limité. Malheureusement, à part l'induction de la néoglucogenèse, rien dans le protéome du mutant que nous avons révélé ne permet vraiment d'expliquer cette hypervirulence.

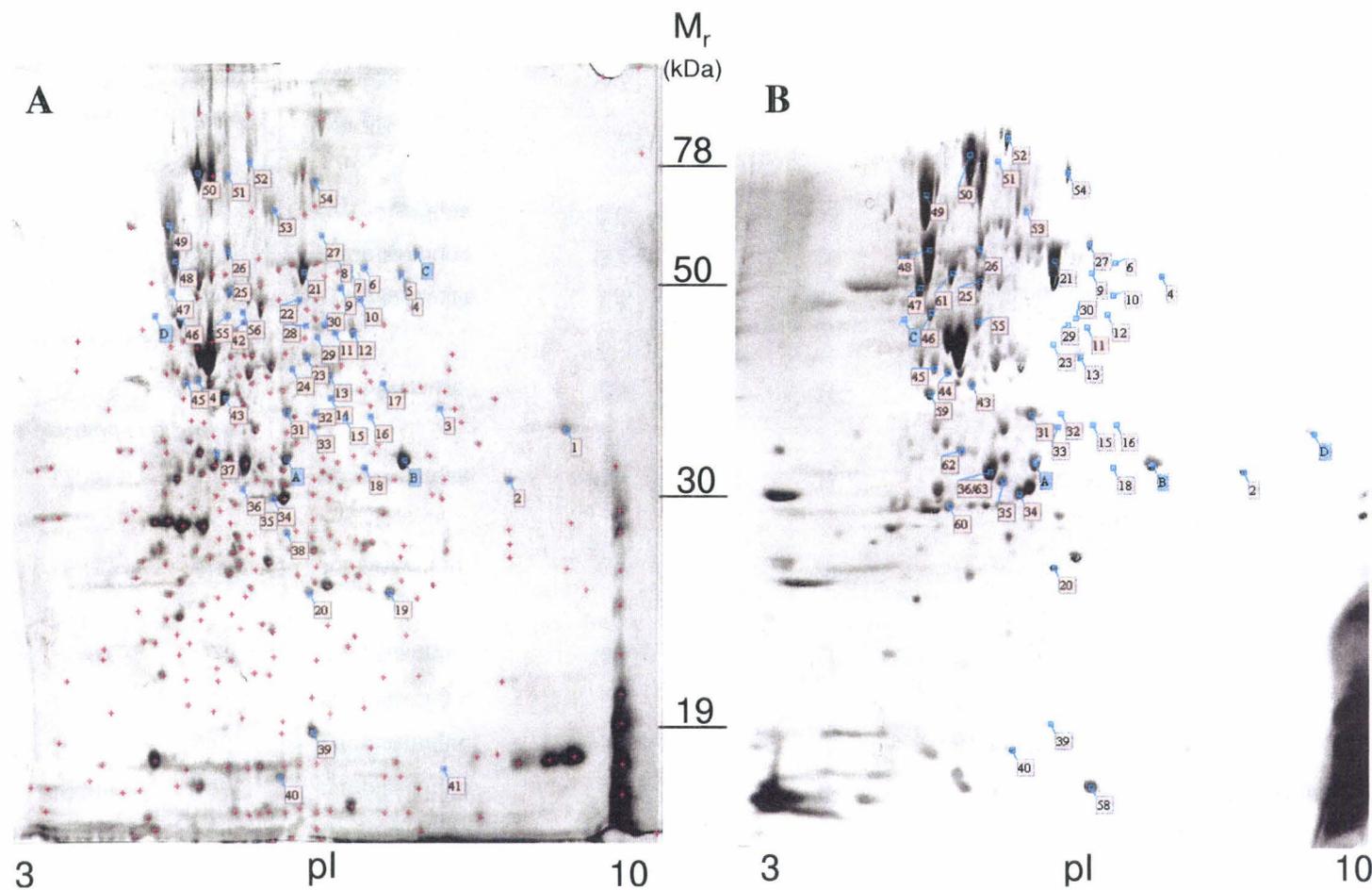


Figure 22 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines solubles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* (A) et du mutant *rcsC2* (B). Les gels sont colorés au nitrate d'argent. Les lettres représentent les spots utilisés pour la calibration des gels et les chiffres, les protéines identifiées.

n° du spot ^a	n° CDS ^b	Gène ^b	Localisation	Ratio ^c NF3611 par rapport à EC3937	% de couverture	Fonction putative ^b
Synthèse des polysaccharides						
25	15220	<i>cpsG</i>	cytoplasmique	1,2	20	phosphomannomutase
18	15224	<i>fcl</i>	cytoplasmique	1,2	30	GDP-L-fucose-synthétase
33	20562	<i>galE</i>	cytoplasmique	1,4	24	UDP-glucose-4-épimerase
32	19489	<i>galF</i>	cytoplasmique	1,8	35	glucose-1P-uridyl transférase
37	20647	<i>galU</i>	cytoplasmique	— ^f	28	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase
24	20463	<i>rffG</i>	cytoplasmique	— ^f	27	dTDP-glucose-4,6-déshydratase
23/28	19487	<i>ugd</i>	cytoplasmique	0,5	31	UDP-glucose déshydrogénase
Régulation						
51	16313	<i>bipA</i>	membranaire	0,3	29	GTPase fixant le ribosome
Détoxification						
20	17551	<i>no name</i>	cytoplasmique	0,8	31	alkyl hydroperoxide réductase
Métabolisme des acides aminés						
11	18183	<i>glyA</i>	membranaire	0,8	16	sérine hydroxyméthyl transférase
Métabolisme des lipides						
4	17046	<i>accC</i>	cytoplasmique	1,1	20	biotine carboxylase
39	19707	<i>fabA</i>	cytoplasmique	0,2	26	β-hydroxydécanoyl thioester déshydratase
35	19259	<i>fabI</i>	cytoplasmique	0,6	35	énoyl-ACP réductase
Métabolisme des nucléotides						
22	15203	<i>purA</i>	cytoplasmique	— ^f	20	adénylosuccinate synthase
30	17763	<i>purB</i>	cytoplasmique	0,7	26	Adénylosuccinate lyase
60	18094	<i>deoC</i>	cytoplasmique	0,3	40	2-déoxyribose-5-phosphate aldolase

62	14549	<i>prsA</i>	cytoplasme	1,1	37	phosphoribosylpyrophosphate synthétase
Métabolisme des sucres						
52	19243	<i>aceE</i>	cytoplasmique	1,5	28	sous-unité de la pyruvate déshydrogénase
31	15181	<i>fbaA</i>	cytoplasmique	2,8	18	fructose-bisphosphate aldolase de classe II
13	18196	<i>ganA</i>	périplasmique	0,8	30	endogalactanase
5	15062	<i>glpD</i>	cytoplasmique	^f -	28	glycérol 3-phosphate déshydrogénase
21	20398	<i>glpK</i>	cytoplasmique	2,9	29	Glycérol kinase
14	15029	<i>glpQ</i>	cytoplasmique	^f -	17	glycérophosphoryl diester phosphodiesterase
12	16958	<i>gltA</i>	cytoplasmique	0,8	34	citrate synthase
55	46981	<i>gnd</i>	cytoplasmique	3,5	27	6-phosphogluconate déshydrogénase
38	20551	<i>gpmA</i>	cytoplasmique	^f -	22	phosphoglycéro-mutase 1
27	17827	<i>pgi</i>	cytoplasmique	1,8	36	phosphoglucose isomérase
50	19893	<i>ppsA</i>	cytoplasmique	2,5	28	phosphoenolpyruvate synthase
53	16955	<i>sdhA</i>	cytoplasmique	0,2	24	succinate déshydrogénase
26	20198	<i>sfcA</i>	cytoplasmique	2,8	26	néoglucogénèse malate déshydrogénase
54	15185	<i>tktA</i>	cytoplasmique	1,7	18	Transcétolase 1 isoenzyme
43	20276	<i>yiaY</i>	cytoplasmique	0,3	40	alcool déshydrogénase
Conformation et dégradation des protéines						
42	19559	<i>clpX</i>	cytoplasmique	^f -	32	sous-unité de la protéase ClpXP
10	15693	<i>degQ</i>	périplasmique	4,3	38	sérine endoprotéase
36/56	15461	<i>fkpA</i>	périplasmique	^g -	39	protéine chaperon FKPB
48	18669	<i>groL</i>	cytoplasmique	1,1	52	sous-unité GroEL de la protéine chaperon GroES/GroEL

40	18667	<i>groS</i>	cytoplasmique	0,9	55	sous-unité GroES de la protéine chaperon GroES/GroEL
6	16590	<i>pepA</i>	cytoplasmique	8	22	aminopeptidase
29	20133	<i>pepB</i>	cytoplasmique	2,4	19	aminopeptidase
9	17747	<i>pepQ</i>	cytoplasmique	1,6	36	proline dipeptidase
47	20523	<i>Tig</i>	cytoplasmique	4,4	54	chaperon "trigger factor"
Transport						
46	14785	<i>atpD</i>	cytoplasmique	0,6	22	sous-unité β de l'ATP synthase
2	18320	<i>gltI</i>	périplasmique	1,9	40	protéine affine du glutamate
34	18377	<i>mglB</i>	périplasmique	2,2	41	protéine affine du galactose
8	20639	<i>oppA</i>	périplasmique	— ^f	29	protéine affine des oligopeptides
16	19819	<i>potF</i>	périplasmique	4,1	31	protéine affine de la putrescine
3	20233	<i>inconnu</i>	périplasmique	— ^f	17	protéine affine du fer
Transcription						
44/45	16922	<i>rpoA</i>	cytoplasmique	2	40	sous-unité α de l'ARN-polymérase
Traduction						
49	46566	<i>rpsA</i>	cytoplasmique	1,6	44	protéine S1 de la sous-unité 30S du ribosome
15	20829	<i>trpS</i>	cytoplasmique	2,6	20	tryptophane ARNt synthétase
58	15252	<i>rplI</i>	cytoplasmique	1,5	66	protéine L9 de la sous-unité 50S du ribosome
Fonction inconnue						
17	15570	<i>ydgJ</i>	inconnu	— ^f	22	inconnue
41	15573	<i>inconnu</i>	inconnu	— ^f	33	inconnue
7	47171	<i>inconnu</i>	inconnu	— ^f	29	inconnue
19	47181	<i>inconnu</i>	inconnu	— ^f	42	inconnue

61	16606	<i>inconnu</i>	inconnu	1,1	21	inconnue
----	-------	----------------	---------	-----	----	----------

Tableau 7 : Identification des protéines solubles différentiellement exprimées chez le mutant *rscC2* d'*E. chrysanthemi*. ^ale numéro des spots correspond aux protéines de la Figure X. ^bdonnées de la banque d'*E. chrysanthemi* (<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm>). ^cintensité du spot pour chaque protéine d'une souche par rapport à la même protéine d'une autre souche. ^dle score correspond à $(-10)\log P$ où P est la probabilité d'observer un recouvrement au hasard. ^enombre de peptides utilisés pour l'identification donc qui recouvre la protéine. ^fprotéines absentes chez mutant *rscC2*. ^gprotéines absentes chez la souche sauvage.

II. Caractérisation d'un locus impliqué dans le catabolisme des galactanes chez *E. chrysanthemi*

La virulence d'*Erwinia chrysanthemi* est en partie due à sa capacité à produire et à sécréter des enzymes dégradant les constituants de la paroi des cellules végétales. La macération des tissus végétaux est visible uniquement lors de la dépolymérisation de la pectine. L'action des enzymes pectinolytiques semble prérequis pour la dégradation des autres constituants de la paroi des cellules végétales par d'autres enzymes. La dégradation complète de la pectine nécessite la combinaison de plusieurs enzymes (Voir Introduction). Chez *E. chrysanthemi*, de nombreuses enzymes impliquées dans la dégradation des homogalacturonanes (HGA) ont été identifiées (Pae, Pem, Pel et Peh). Par contre, une seule enzyme, RhiE, capable de dégrader les rhamnogalacturonanes de type I (RGI) a été identifiée. Aucune enzyme n'est actuellement connue pour la dégradation des composants des chaînes latérales. Ce travail concerne l'identification d'un nouveau système impliqué dans la dégradation et le transport d'un composant constituant une des chaînes latérales de la pectine, les galactanes.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, Lyon) et avec Anne-France Prouvost, doctorante du laboratoire. Elles ont notamment réalisées l'ensemble des constructions génétiques nécessaires à ce travail.

A. Identification du locus *gan*

Lors de 2 études protéomiques chez *E. chrysanthemi*, une abondante protéine (CDS 18196) a été identifiée (Babujee et coll 2007 ; Bouchart et coll., 2007). Cette protéine présente un haut degré de similarité avec une endo- β -1,4-galactanase putative de *Yersinia pestis* (83 %) et d'*E. carotovora ssp. atroseptica* (79 %) mais aussi avec l'endo- β -1,4-galactanase de *Bacillus licheniformis* (53 %). L'analyse de la séquence nucléotidique révèle que le gène codant cette protéine appartient à un locus de 9 gènes. Ce locus semble être impliqué dans le catabolisme des galactanes. Nous avons donc appelé ces gènes *gan*. Le gène codant l'endo- β -1,4-galactanase a été appelé *ganA*. Ce locus est organisé en 4 unités de transcription : *ganR*, *ganL*, *ganEFGABC* et *ganK* (Figure 23). Ce locus et son organisation génétique est conservée chez le genre *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*) mais il est absent chez *E. coli*. Chez *E. carotovora*, tous ces gènes sont retrouvés avec la même organisation à l'exception de *ganR*, absent, et *ganL*, localisé de l'autre côté du locus et transcrit dans la

direction opposé (Figure 23). Dans le génome de ces bactéries, aucun gène adjacent à ce locus n'est conservé.

Le gène *ganB* code une protéine possédant de forte similarité avec des β -galactosidases de plusieurs espèces bactériennes telles que *Y. pestis* (84 %), *E. carotovora* (83 %), *Bacillus circulans* (76 %) ou *Clostridium perfringens* (72 %). Le gène *ganC* code une forme tronquée de 106 acides aminés de l'enzyme IIBC du système PTS (« Phospho Transferase System ») de transport du glucose de nombreuses espèces bactériennes. Bien que cette protéine soit conservée parmi plusieurs espèces bactériennes (86 % et 75 % de similarité respectivement pour *Y. pestis* et *E. carotovora*), aucune fonction n'a pu lui être attribuée. Les protéines codées par les gènes *ganL*, *ganE*, *ganF*, *ganG* et *ganK* formeraient un système de transport des galactanes chez *E. chrysanthemi*. Ces gènes sont étroitement liés aux gènes codant le système de transport du maltose et des maltodextrines chez *E. coli*. Les gènes *gan* ont d'ailleurs été nommés en fonction de leur similitude avec le gène correspondant du système maltose. Le gène *ganL* code une protéine de la membrane externe présentant 48 % de similarité avec le transporteur du maltose, LamB, situé dans la membrane externe. Le gène *ganE* code une protéine affine périplasmique présentant 45 % de similarité avec la protéine affine périplasmique du maltose, MalE. Les gènes *ganF* et *ganG* codent deux sous-unités d'une perméase présentant respectivement 62 % et 56 % de similarité avec MalF et MalG, les deux protéines de la perméase du maltose chez *E. coli*. Le gène *ganK* code une protéine ayant 72 % de similarité avec l'ATPase MalK. De plus, le gène *ganR* code probablement un régulateur car il présente 62 % de similarité avec le répresseur LacI de l'opéron lactose chez *E. coli*.

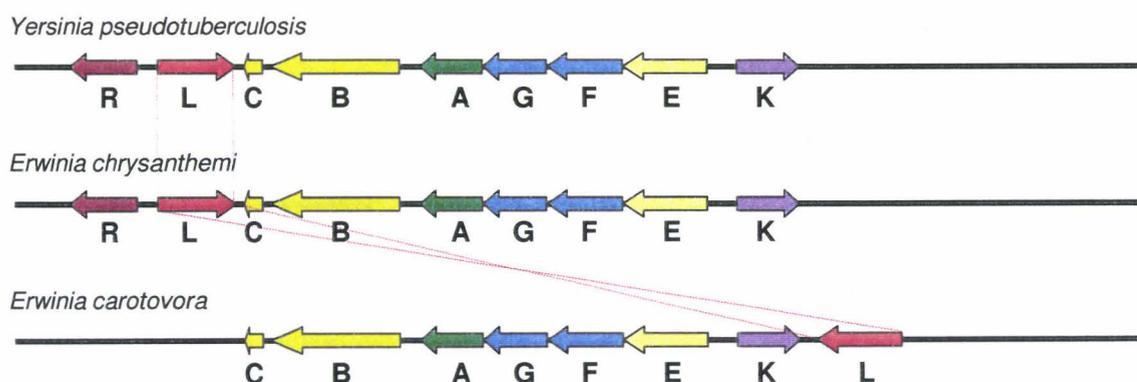


Figure 23 : Organisation génétique du locus *gan* d'*E. chrysanthemi*, de *Y. pseudotuberculosis* et d'*E. carotovora*. Les flèches indiquent les localisations des phases ouvertes de lecture et la direction de la transcription des gènes. Le nom des gènes *gan* est précisé en dessous de chaque flèche.

B. Caractérisation de l'enzyme GanA

La souche sauvage (EC3937) et le mutant dérivé *ganA* (A4809) ont été mis en croissance sur milieu minimum contenant du glycérol comme seule source de carbone et de l'AZCL-galactane. L'AZCL-galactane est un substrat spécifique de la détection d'activité endo- β -1,4-galactanase. Après 16 h de croissance à 30°C, un halo bleu indiquant la dégradation du substrat AZCL-galactane est présent uniquement autour des colonies de la souche sauvage. Le mutant *ganA* ne dégrade pas ce substrat démontrant que le gène *ganA* code bien une endo- β -1,4-galactanase (Figure 24).

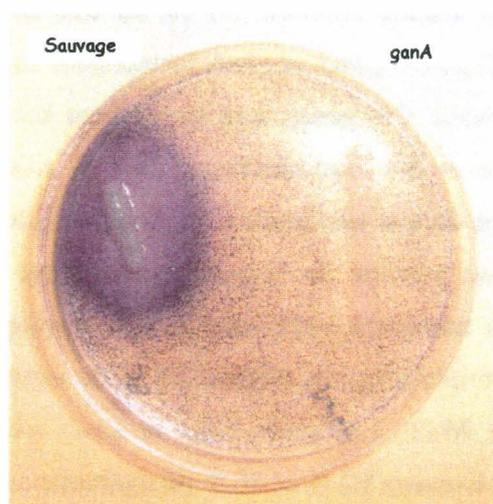


Figure 24 : Test d'activité endo- β -1,4-galactanase sur milieu minimum contenant du glycérol et de l'AZCL-galactane pour la souche sauvage et le mutant *ganA*. La présence d'un halo bleu, uniquement observé pour la souche sauvage, indique une dégradation de ce substrat.

1. Structure 3D de GanA

La séquence primaire de GanA suggère que cette protéine fait partie de la famille 53 dans la classification des glycosides hydrolases (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Bairoch, 1993 ; <http://www.cazy.org/index.html>). Cette famille GH53 appartient au groupe GH-A avec de nombreuses autres familles. Toutes les enzymes du groupe GH-A ont en commun un repliement de type tonneau (α/β)₈ (Nagano et coll., 2002) et une activité enzymatique clivant une liaison glycosidique par une catalyse acide (McCarter et Withers, 1994). Cette catalyse implique généralement deux résidus d'acide glutamique, l'un donneur de proton et l'autre nucléophile.

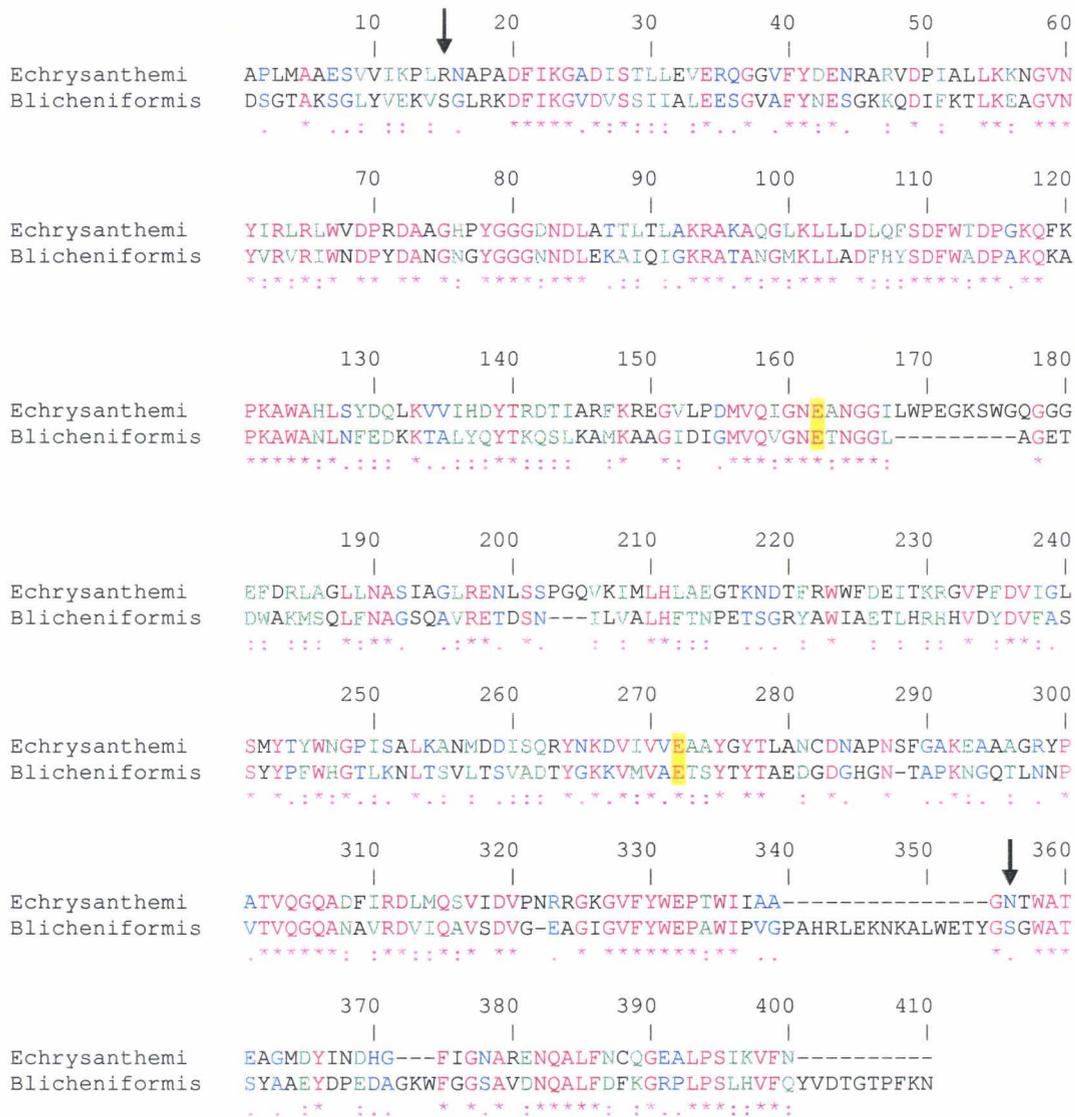


Figure 25: Aligement des séquences protéiques de l'endo-β-1,4-galactanase d'*E. chrysanthemum* et celle de *Bacillus licheniformis*. Les résidus catalytiques glutamique (E) sont surlignés en jaune. Les flèches indiquent le 1^{er} acide aminé et le dernier utilisés pour établir le modèle 3D.

Une comparaison par ClustalW de l'endo- β -1,4-endogalactanase d'*E. chrysanthemi* avec celle de *Bacillus licheniformis* a été réalisée (YP093782) (Figure 25). L'endo- β -1,4-endogalactanase de *B. licheniformis* présente le pourcentage d'homologie le plus élevé (53 %) avec GanA d'*E. chrysanthemi* et la structure 3D de cette protéine est connue. Ainsi pour réaliser une prédiction de structure de l'endo- β -1,4-galactanase GanA d'*E. chrysanthemi*, nous avons choisi comme modèle de référence la protéine cristallisée de *B. licheniformis* (Ryttersgaard et coll., 2004). Le modèle en 3D de GanA a été réalisé de l'acide aminé Arg-15 à l'acide aminé Asn-341 (Figure 26) en utilisant un programme de modélisation moléculaire par homologie, Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>). La conservation des motifs près des résidus catalytiques permet la prédiction des deux résidus catalytiques de GanA, Glu-142 et Glu-272, et de leur fonction respective de donneur de proton et de nucléophile (Figure 25). Nous avons pu représenter ces résidus catalytiques sur la structure 3D de GanA grâce au logiciel Bioeditor (<http://bioeditor.sdsc.edu/>) (Figure 26).

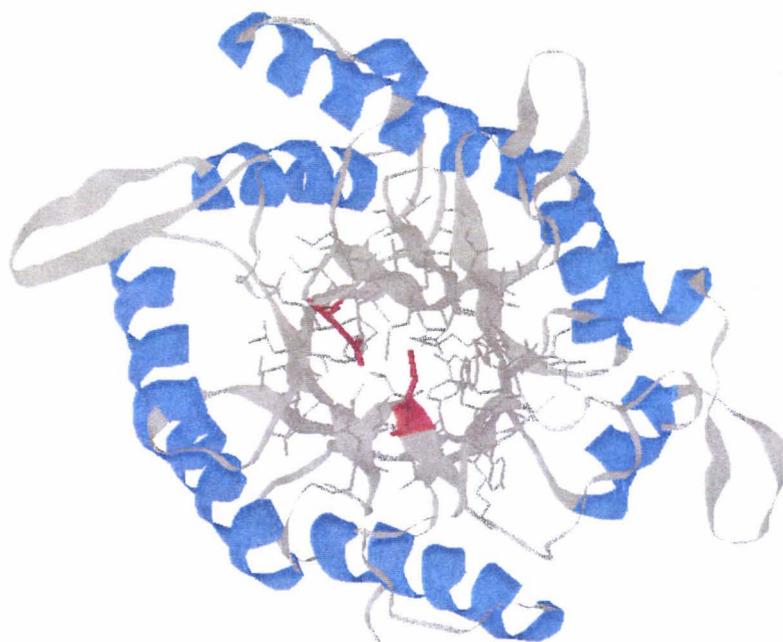


Figure 26 : Illustration d'un modèle de la structure 3D de GanA d'*E. chrysanthemi*. Les résidus catalytiques sont représentés en rouge. En gris, sont représentés les feuillets β et en bleu, les hélices α (JP Bohin).

2. Localisation de GanA

Le gène *ganA* code une protéine prédite de 400 acides aminés. L'analyse avec les logiciels Psort (<http://psort.nibb.ac.jp/>) et SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) prédit la présence d'une séquence signal en N-terminal de 20 acides aminés avec un site de clivage entre deux résidus alanine (Bendtsen et coll., 2004). Ceci suggère que la protéine GanA mature est une protéine exportée.

Pour déterminer la localisation cellulaire, nous avons testé l'activité endo- β -1,4-galactanase de différentes fractions sub-cellulaires en utilisant l'AZO-galactane comme substrat (Tableau 8). Après centrifugation des cellules sauvages, toute l'activité est détectée dans le culot cellulaire alors qu'aucune activité n'est détectée dans le surnageant. Cette localisation intracellulaire est confirmée par de précédentes études protéomiques d'*E. chrysanthemi*. En effet, GanA est faiblement retrouvée dans la fraction membranaire (Babujee et coll., 2007) et qu'elle est largement retrouvée parmi les protéines solubles (Bouchart et coll., 2007) mais pas parmi les protéines extracellulaires (Kazemi-Pour et coll., 2004). Plus de 90 % de l'activité endo- β -1,4-galactanase est retrouvée dans les extraits périplasmiques. Ces résultats démontrent que GanA est une protéine périplasmique.

	extrait total	culot cellulaire	surnageant	cytoplasme	périplasma
Activité endo- β -1,4-galactanase	100 %	89 %	0 %	0 %	96 %

Tableau 8 : Activité endo- β -1,4-galactanase (en %) sur AZO-galactanes dans différentes fractions sub-cellulaires.

3. Purification de GanA et détermination de ses propriétés

Nous avons purifié GanA à partir d'extraits périplasmiques en réalisant d'abord une filtration sur gel suivie d'une chromatographie d'échange d'anions. Nous avons obtenu un taux de purification de 67 fois avec un rendement de 55 %. Le poids moléculaire apparent de GanA est estimé par SDS-PAGE (Figure 27). Ce poids moléculaire est en adéquation avec la taille de la protéine mature déduite à partir de la séquence primaire (41800 Da).

Nous avons testé l'activité de GanA sur AZO-galactane à différents pH et différentes températures (Figure 28). Cette enzyme a un pH optimum de 5,8 (± 0.2) et une température optimale de 50°C ($\pm 5^\circ\text{C}$). Cette température est 20°C au dessus de la température optimale de croissance d'*E. chrysanthemi*. A cette température de 30°C, l'enzyme ne possède plus que 30 % de son activité maximale.

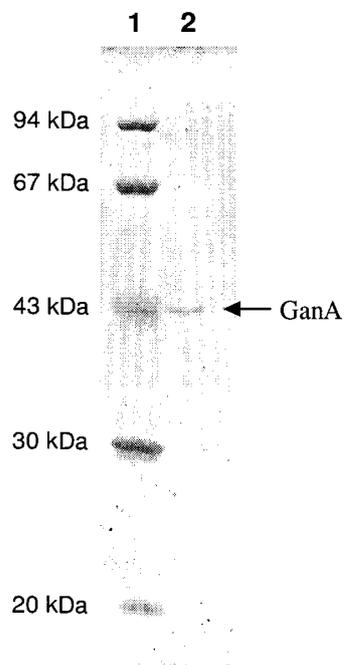


Figure 27 : SDS-PAGE de GanA purifiée : puit 1, marqueur de masse moléculaire ; puit 2, GanA purifiée.

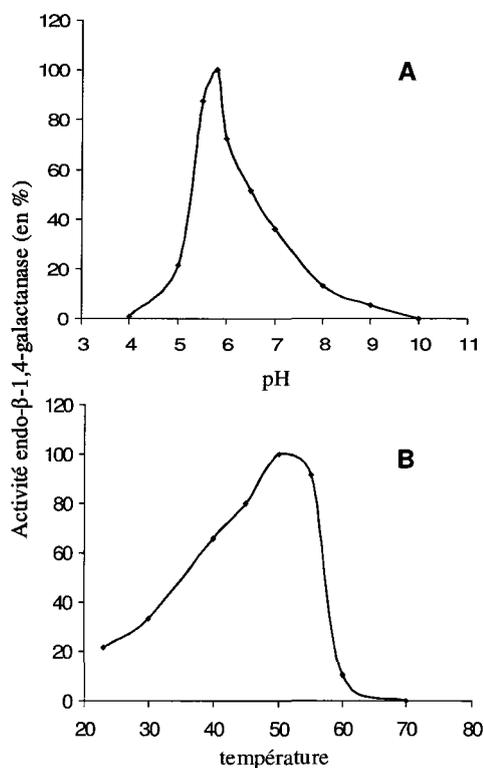


Figure 28 : Courbes d'activité de GanA en fonction du pH (A) et de la température (B).

4. Activité de GanA

Nous avons analysé, *in vitro*, les produits issus de la dégradation des galactanes pectiques par GanA. La digestion est réalisée à 50°C dans du tampon acétate de sodium 0,2 M à pH 5,8. Dans un premier temps, les extrémités réductrices des galactanes pectiques ont été dosées par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) suivant le temps de digestion par GanA (Figure 29). On peut constater que le nombre d'extrémités réductrices libérées pendant les 15 premières minutes est proportionnelle au temps de digestion par GanA. Après ces 15 minutes, on observe un ralentissement progressif jusqu'à atteindre un plateau au bout de 30 minutes.

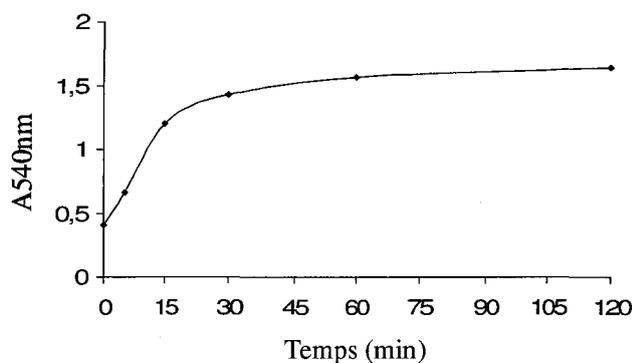


Figure 29 : Dosage au DNS des extrémités réductrices des galactanes après digestion par GanA à différents temps.

Dans un second temps, nous avons analysé, en détails, les produits de dégradation issus de la digestion par GanA par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Cette méthode nécessite la présence d'une matrice pour l'ionisation des échantillons. Nous avons réalisé l'analyse sur les temps d'incubation suivants : 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 et 120 minutes. A ces différents temps, nous observons le même profil de spectre (Figure 30) avec principalement la présence de galactotriose (Gal₃), de galactotétraose (Gal₄), de galactopentaose (Gal₅) et de galactohéxaose (Gal₆). Nous avons représenté le pourcentage relatif des différents produits à 15, 30, 60 et 120 minutes (Figure 31). Nous obtenons un pourcentage respectif d'environ 18 %, 66 %, 13 % et 2 % pour le Gal₃, Gal₄, Gal₅ et Gal₆. Nous n'observons pas la présence de monomères ni de dimères par cette analyse mais ces deux sucres sont difficilement détectables en MALDI-TOF car leur pic de masse se situe dans les pics de masse de la matrice. Pour exclure totalement la présence de ces deux sucres, nous avons réalisé après 4h de réaction, une analyse en spectrométrie de masse de type Q-STAR dont la méthode d'ionisation se fait par électrobulbation donc sans matrice. Nous observons le même profil avec toujours l'absence de galactose et de galactobiose. Finalement, même après des temps plus longs d'incubation avec GanA, les produits de dégradation sont toujours les mêmes sur des temps où le nombre d'extrémités réductrices augmente. Ces résultats semblent indiquer une processivité de l'enzyme.

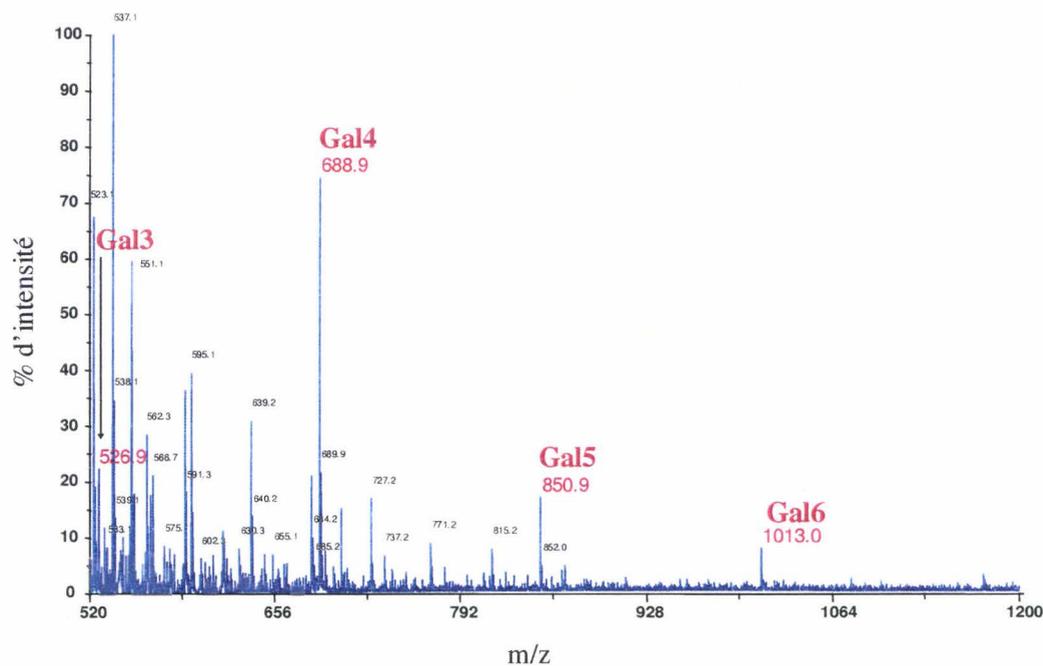


Figure 30 : Spectre de masse de type MALDI-TOF en mode positif des produits de dégradation des galactanes après 2h de digestion par GanA.

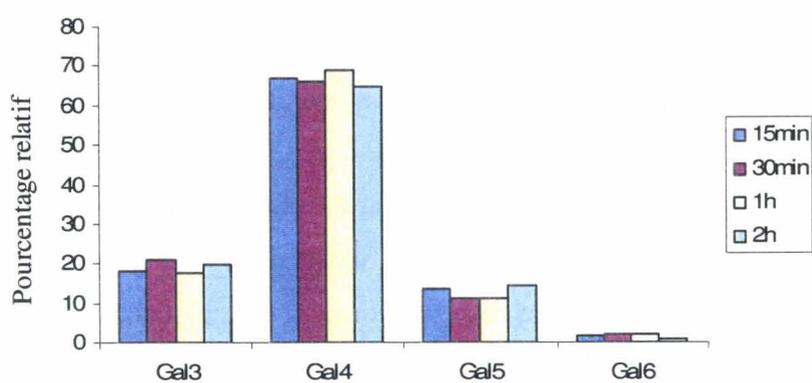


Figure 31 : Distribution des produits de dégradation des galactanes par GanA après différents temps d'incubation à 50°C.

Le mutant *ganA* (A4809) ne possède plus d'activité endo- β -1,4-galactanase sur AZO-galactanes. Nous avons testé la croissance d'une souche sauvage et d'un mutant *ganA* sur milieu minimum contenant 0,2 % de galactose, de galactanes ou d'oligogalactanes (obtenus par l'hydrolyse *in vitro* des galactanes pectiques par GanA) comme seule source de carbone (Tableau 11). Le taux de croissance est le même pour les deux souches lorsqu'on les fait croître sur milieu minimum contenant du galactose. Contrairement à la souche sauvage, le mutant *ganA* est incapable de croître sur milieu minimum contenant des galactanes comme seule source de carbone. L'endogalactanase périplasmique est donc nécessaire à l'utilisation des galactanes. Le taux de croissance sur oligogalactanes du mutant *ganA* est d'environ 20 % par rapport à celui de la souche sauvage même après 72h d'incubation. Ainsi une large partie des oligogalactanes, produits *in vitro* par GanA, ne serait pas utilisée *in vivo* par un mutant *ganA*. Une hypothèse est que l'effet polaire de la mutation *ganA* sur *ganB* est responsable d'une réduction d'activité de GanB (voir paragraphe C). Une autre hypothèse est que le système de transport ne reconnaît que les gal₃. L'ensemble de ces résultats démontre que GanA catalyse le clivage des galactanes en oligogalactanes.

C. Caractérisation de l'enzyme GanB

Lors de l'analyse du catabolisme du lactose chez *E. chrysanthemi*, deux gènes, *lacZ* et *lacB*, ont été décrits comme codant des enzymes cytoplasmiques avec une activité de β -galactosidase (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1985). L'analyse du génome d'*E. chrysanthemi* révèle deux gènes potentiels, *ganB* et *lacZ*, codant une protéine de la famille GH42 homologue à la β -galactosidase d'*E. coli*, LacZ. Ainsi, *lacB* et *ganB* seraient le même gène. Nous avons voulu tester cette hypothèse et aussi voir la part d'activité représentée par chacune des enzymes dans l'activité β -galactosidase totale chez *E. chrysanthemi*. Pour cela, l'activité β -galactosidase de la souche sauvage et des mutants *lacZ* (NFB3680), *ganB* (NFB3666) et *ganB, lacZ* (NFB3687) a été analysée en utilisant l'ONPG comme substrat (Tableau 10). Aucune activité β -galactosidase n'est détectée dans le double mutant *ganB, lacZ*. Plus de 95 % de l'activité β -galactosidase est retrouvée chez le mutant *lacZ* et moins de 5 % de cette activité est retrouvée chez le mutant *ganB*. Ces résultats indiquent que *lacB* et *ganB* sont le même gène et que GanB possède la principale activité β -galactosidase chez *E. chrysanthemi*. De plus, l'activité β -galactosidase chez le mutant *ganA* et *ganE* représente environ 20 % de l'activité chez la souche sauvage. Ces mutations ont donc un effet partiellement polaire sur le gène *ganB*.

Souches	Activité β -galactosidase spécifique (nmol/min/mg)	Activité β -galactosidase spécifique en %
3937 (sauvage)	252	100
NFB3680 (<i>lacZ</i>)	241	96
A4807 (<i>ganB</i>)	7	3
NFB3687 (<i>lacZ, ganB</i>)	0	0
A4809 (<i>ganA</i>)	46	18
A4810 (<i>ganE</i>)	49	19
A4863 (<i>ganR</i>)	58	23

Tableau 10 : Activité β -galactosidase spécifique de la souche sauvage et de différents mutants d'*E. chrysanthemi*. L'activité spécifique est exprimée en nmol d'ONP libéré par min et par mg de protéine.

souches	Croissance sur galactose	Croissance sur galactanes	Croissance sur Gal ₃ à Gal ₆
3937 (sauvage)	1	0,7	0,7
A4809 (<i>ganA</i>)	1	0	0,13
A4807 (<i>ganB</i>)	1	0	0
A4868 (<i>ganL</i>)	1	0	0,17
A4810 (<i>ganE</i>)	1	0	0
NFB3710 (<i>ganK</i>)	1	0	0
A4863 (<i>ganR</i>)	1	0,7	0,7

Tableau 11 : Croissance de la souche sauvage et de différents mutants d'*E. chrysanthemi*. Les bactéries sont cultivées en sur milieu M63 contenant du galactose, des galactanes ou des oligogalactanes (Gal₃ à Gal₆) comme seule source de carbone (0,2 %). Le rendement de croissance est exprimé à DO_{620nm} en phase stationnaire de croissance.

Nous avons testé la croissance des mutants *ganB* et *lacZ* sur milieu solide contenant des galactanes pectiques comme seule source de carbone. Alors que la croissance pour le mutant *lacZ* est normale, aucune croissance n'est observée pour le mutant *ganB*. Ceci indique que GanB est nécessaire pour l'utilisation des galactanes contrairement à LacZ. De plus, le mutant *ganB* est incapable de croître sur les oligogalactanes, obtenus après hydrolyse *in vitro* des galactanes par GanA (Tableau 11). Ces résultats supportent l'hypothèse que GanB est une exogalactanase cytoplasmique impliquée dans le clivage en galactose des oligogalactanes libérés par GanA. Le substrat de LacZ chez *E. chrysanthemi* n'est pas déterminé mais son activité doit être différente de celle d'*E. coli*. En effet, chez *E. coli*, LacZ fait parti du système de transport du lactose or *E. chrysanthemi* ne possède pas la perméase LacY et n'est pas capable de croître sur le lactose.

D. Caractérisation du système de transport des galactanes

Le locus *gan* comporte plusieurs gènes qui coderaient un système de transport des galactanes chez *E. chrysanthemi*. La protéine GanL serait une porine. Les protéines GanE, GanF, GanG et GanK formeraient un système de transport de type ABC avec GanE, la protéine affine périplasmique, GanF et GanG, les deux sous-unités de la perméase et GanK, l'ATPase. Pour déterminer si ces protéines sont bien impliquées dans le transport des galactanes, nous avons comparé la croissance des mutants *ganL*, *ganE* et *ganK* avec celle de la souche sauvage sur milieu minimum contenant soit du galactose, des galactanes ou des oligogalactanes comme source de carbone (Tableau 11). Toutes ces souches donnent le même rendement sur galactose. Le système *gan* ne possède donc aucun rôle dans le transport du galactose. Par contre, les mutants *ganE* et *ganK* sont incapables de croître sur galactanes ou oligogalactanes. Ces deux éléments du système de transport de type ABC sont nécessaires pour l'utilisation de ces glycanes. Puisque GanA est l'enzyme périplasmique responsable du clivage des galactanes, le système de transport Gan de type ABC est certainement responsable du passage des oligogalactanes à travers la membrane interne plutôt que de celui des galactanes. Le mutant *ganL* n'assimile pas les galactanes et montre une croissance réduite d'environ 20 % sur les oligogalactanes. Cette faible croissance résulte probablement du transport des petits oligomères tels que les Gal₃, qui sont probablement capables de diffuser à travers une porine non spécifique. Ainsi GanL est bien une porine spécifique du transport des galactanes à travers la membrane externe.

E. Régulation des gènes *gan*

Nous prédisons 4 unités de transcription pour le locus *gan* (Figure 23). Pour déterminer la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'utilisation des galactanes, Anne-france Prouvost et Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat ont construit, chez *E. chrysanthemi*, des fusions transcriptionnelles des gènes *ganA* (A4809), *ganB* (4807), *ganE* (A4810), *ganK* (NFB3701) et *ganL* (A4868) avec le gène *uidA*, gène codant une activité β -glucuronidase.

1. La source de carbone

Les bactéries sont mises en culture en milieu minimum contenant du glycérol, du galactose, du glucose ou du saccharose comme seule source de carbone jusqu'à une DO_{620nm} de 0,8 (Figure 32). Les cellules sont alors centrifugées, cassées à la presse de French et l'activité β -glucuronidase du surnageant est mesurée. En présence de glucose et de saccharose, l'expression diminue d'un facteur 3 (*ganB*) à un facteur 7 (*ganL*) par rapport à l'expression en présence de galactose ou de glycérol. Ces résultats suggèrent les gènes du locus *gan* sont soumis à la répression catabolique contrôlée par la protéine CRP (« cAMP receptor protein »). Ce type de régulation a déjà été décrit pour plusieurs systèmes impliqués dans la dégradation de la paroi des cellules végétales chez *E. chrysanthemi* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996). Une séquence consensus potentielle de fixation de la protéine CRP est trouvée devant les 3 unités de transcription du locus *gan* (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/cgi/consensus2.cgi>). Pour tester cette régulation, une mutation *crp::Cml* d'*E. chrysanthemi* a été transduite dans les souches contenant les fusions *ganK::uidA*, *ganE::uidA* ou *ganL::uidA* (Figure 33). La croissance des souches a été réalisée en milieu 63 contenant du glucose comme source de carbone. En présence de la mutation *crp*, une diminution de 3 fois et de 5 fois est observée pour l'expression de *ganK* et de *ganE* et une diminution de 83 fois est observée pour l'expression de *ganL*. Pour les gènes pectinolytiques, une diminution de 2 à 260 fois est observée dans un contexte *crp* selon les gènes testés (Reverchon et coll., 1997). Le locus *gan* est donc bien soumis à la répression catabolique.

2. La phase de croissance

Après croissance en milieu minimum contenant du glycérol, nous avons testé l'activité endo- β -1,4-galactanase sur AZO-galactanes en phase exponentielle ($DO_{620nm}=0,5$) et phase stationnaire de croissance ($DO_{620nm}=2$) (Tableau 12). On peut observer que l'activité de GanA est augmentée de plus de 3 fois entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

DO	Activité endo- β -1,4-galactanase en $\Delta A_{590\text{nm}}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine
0,5	0,083
2,0	0,309

Tableau 12 : Activité endo- β -1,4-galactanase sur AZO-galactanes en phase exponentielle (DO=0,5) et en phase stationnaire (DO=2,0) après croissance sur milieu minimum contenant du glycérol.

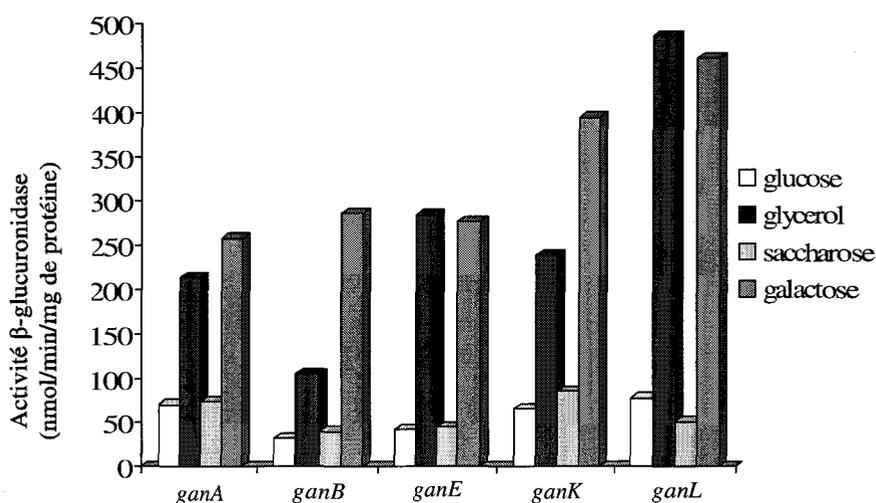


Figure 32 : Activité β -glucuronidase des fusions des gènes *ganA*, *ganB*, *ganE*, *ganK*, *ganL* avec le gène *uidA* en fonction de différentes sources de carbone.

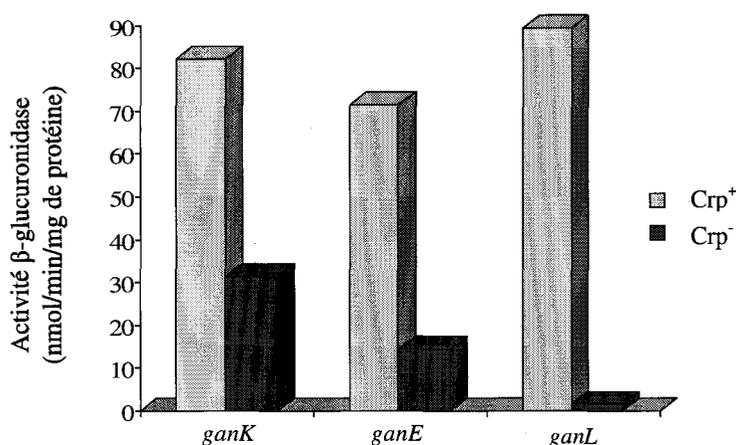


Figure 33 : Activité β -glucuronidase des fusions des gènes *ganK*, *ganE* et *ganL* avec le gène *uidA* mesurée dans un contexte sauvage ou dans un contexte *crp*:Cml (Crp⁻) en milieu minimum contenant du glucose comme source de carbone.

L'étude de la souche contenant la fusion *ganA::uidA* confirme ces résultats. GanA est donc surexprimée pendant la phase stationnaire.

3. Régulation par GanR

Ce travail a été réalisé par Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat. Un gène régulateur, *ganR*, est présent dans le locus *gan*. Ce gène est conservé dans les locus *gan* de *Y. pestis*, de *Y. pseudotuberculosis*, d'*E. carotovora* et de *Klebsiella pneumoniae*. GanR doit donc être impliqué dans la régulation de la transcription des gènes *gan*. Pour tester cette hypothèse, un mutant *ganR::Cml* (A4863) a été construit. Cette mutation a été ensuite transduite dans les souches contenant les fusions *ganK::uidA* et *ganE::uidA*. L'activité β -glucuronidase des fusions a été mesurée dans un contexte sauvage et dans un contexte *ganR* (Figure 34) en utilisant le glycérol comme source de carbone. En présence de la mutation *ganR*, l'expression de *ganE* et de *ganK* diminue respectivement d'un facteur 8 et 5. On peut également observer dans un mutant *ganR* une diminution de l'activité β -galactosidase caractérisant une diminution d'expression de *ganB* (L'activité de LacZ étant négligable) (Tableau 10). Ainsi GanR serait un activateur contrôlant la synthèse des protéines impliquées dans la dégradation des galactanes chez *E. chrysanthemi*.

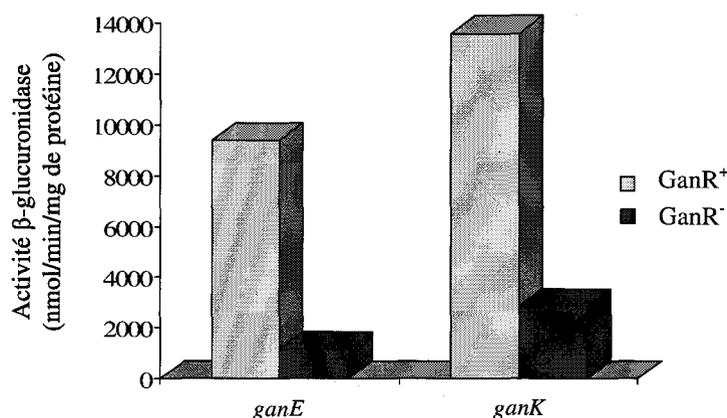


Figure 34 : Activité β -glucuronidase des fusions des gènes *ganE* et *ganK* avec le gène *uidA* dans un contexte sauvage ou dans un contexte *ganR::Cml* dans un milieu minimum contenant du glycérol comme source de carbone.

GanR appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de type LacI. Les sites de fixation à l'ADN de ces régulateurs sont généralement composés de deux séquences imparfaites répétées inversées de 9 nucléotides avec une paire centrale de GC (Gelfand et

Laikova, 2003). La présence de sites potentiels de fixation de GanR dans les régions 5' non-codantes des gènes *gan* a été recherchée. Un palindrome imparfait avec une paire centrale de GC a été trouvé dans la région intergénique *ganK-ganE*, et une séquence homologue est observée dans la région intergénique *ganR-ganL* (Figure 23). La séquence consensus du site potentiel de fixation de GanR est ATGTGAACCGTAatACaT (les lettres minuscules indiquent des nucléotides moins conservés). La présence de ces séquences à l'extrémité 5' non-codante des gènes *gan*, nous amène à penser que GanR, régulateur transcriptionnel de type LacI, contrôlerait directement la transcription de ces gènes.

F. Implication du locus *gan* dans l'infection

1. L'expression durant l'infection

L'expression des fusions transcriptionnelles *ganA* et *ganE* sont analysées après l'infection de feuilles d'endive à 30°C pendant 24h en comparaison avec la fusion avec le gène *pelD* (codant une pectate-lyase) connu comme fortement induit dans ces conditions (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992). *ganA* et *ganE* sont transcrits à un haut niveau dans le tissu macéré, respectivement 4 et 3 fois plus que *pelD* (Figure 35). Donc même s'ils ne sont pas essentiels pour la maladie, les gènes *gan* sont exprimés pendant l'infection de la plante.

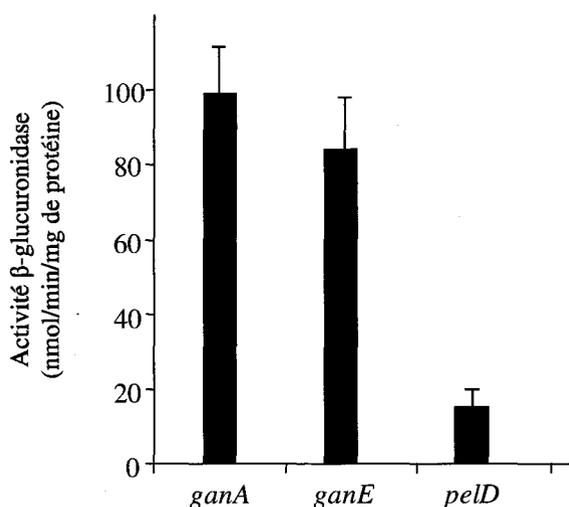


Figure 35 : Activité β-glucuronidase des fusions des gènes *ganA*, *ganE* et *pelD* après 24h de macération sur les feuilles d'endives, d'après Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat.

2. La virulence

La virulence de différents mutants *gan* (*ganR*, *ganA* et *ganE*) a été testée en mesurant la macération de ces mutants par rapport à celle de la souche sauvage après inoculation de tubercules de pomme de terre, de feuilles d'endives et feuilles de *Saintpaulia ionantha*. Aucune différence de macération n'est observée chez les différentes souches et la croissance bactérienne n'est pas affectée chez les mutants *gan*. Ces résultats montrent que la dégradation des galactanes n'est pas essentielle au développement de la maladie sur ces 3 hôtes.

III. Etude des relations entre RcsC, RcsD, RcsF et les OPG

Chez *E. coli*, en absence d'OPG, le système Rcs est activé. Nos études antérieures indiquent que le même phénomène se produit chez *E. chrysanthemi*. Cette activation est dépendante de la lipoprotéine RcsF au moins pour la régulation de la synthèse des exopolysaccharides (Shiba et coll., 2004). La surexpression de RcsF en absence de tout autre signal suffit à activer le système Rcs (Castanié-Cornet et coll., 2006) et conduit à une augmentation de la synthèse des exopolysaccharides (Gervais et Drapeau, 1992). Ainsi RcsF, par sa localisation au niveau de la membrane externe, pourrait percevoir des perturbations de la surface cellulaire causées par diverses conditions (choc osmotique, défaut du LPS, défaut des phospholipides,...) et activer le système Rcs par une interaction directe ou indirecte avec la boucle périplasmique de la protéine RcsC et/ou RcsD dans le périplasme (Majdalani et coll., 2005). Les OPG pourraient moduler ces interactions. La boucle périplasmique de RcsD est beaucoup plus conservée que celle de RcsC au sein de diverses entérobactéries (Figure 36 et 37). Nous avons entrepris une étude pour comprendre la relation entre ces différents partenaires. Cette étude doit se faire en 2 parties : une étude biochimique visant à déterminer les interactions entre les boucle de RcsC et de RcsD avec une version soluble de RcsF (c'est-à-dire dépourvue des acides gras) et les OPG, et une partie physiologique en observant les phénotypes lors de la surexpression des boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD en présence ou non des OPG et en présence de la version soluble de RcsF. Ce travail est réalisé sur les protéines d'*E. chrysanthemi* chez *E. coli*.

A. Expression des boucles périplasmiques de RcsC et RcsD

Nous avons tout d'abord cherché à purifier les boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD afin de pouvoir réaliser des tests d'interactions *in vitro*. Pour la purification, nous avons cloné les séquences de ces boucles périplasmiques avec deux étiquettes différentes : une étiquette polyhistidines (His)₆ dans le plasmide pet29a (voir annexes) et une étiquette Glutathion-S-tranférase (GST) dans le plasmide pgex6P (voir annexes). L'étiquette (His)₆ se situe en C-terminal de la séquence protéique tandis que l'étiquette GST se situe en N-terminal. Nous avons choisi d'utiliser ces étiquettes différentes car la quantité, la solubilité et le conformation de la protéine recombinante peut varier selon l'étiquette utilisée. Ces deux étiquettes présentent des avantages différents. L'étiquette GST est une protéine soluble de 26 kDa, son utilisation augmenterait la solubilité de la protéine en fusion. L'étiquette (His)₆ est une étiquette très courte qui pourrait faciliter la purification de la protéine en fusion présente dans

des corps d'inclusion et faciliter la purification de la protéine recombinante dans des conditions de dénaturation totale qui solubiliseraient la protéine (pET system manual). De plus, la courte taille de cette séquence faciliterait son analyse en RMN et rendrait possible son analyse par Biacore.

Les séquences protéiques de RcsC et de RcsD contiennent deux segments transmembranaires séparés par un large domaine périplasmique. Ce sont les séquences nucléotidiques codant ces domaines que nous avons clonées. Ils s'étendent du codon codant le premier acide aminé suivant le domaine transmembranaire au codon codant le dernier acide aminé précédent le deuxième domaine transmembranaire (Figure 36 et 37). La boucle périplasmique de RcsC possède 272 acides aminés (soit 29,9 kDa) et celle de RcsD 266 acides aminés (soit 29,3 kDa). Contrairement à la boucle périplasmique de RcsD, celle de RcsC possède deux résidus cystéines. L'établissement d'un pont disulfure dans la boucle périplasmique de RcsC n'est donc pas exclu.

Nous avons étudié l'expression des quatre protéines recombinantes. Après avoir cultivé ces souches à 37°C jusqu'à une DO_{620nm} de 0,5, l'expression est induite par l'addition d'IPTG 0,05 mM dans la culture bactérienne. L'induction est réalisée pendant 3 h à 37°C. Nous avons ensuite récupéré les protéines solubles et les protéines insolubles. Ces deux fractions ainsi qu'un extrait total sont analysés sur gel SDS-PAGE. Nous obtenons exactement le même type de profil pour l'expression de la boucle périplasmique de RcsC et de RcsD. Je n'ai représenté ici que le gel SDS-PAGE de l'expression de RcsD (Figure 38). Comme attendu, on observe un spot intense à un poids moléculaire d'environ 55 kDa pour les boucles périplasmiques en fusion avec la GST et d'environ 30 kDa pour la fusion avec les 6 histidines.

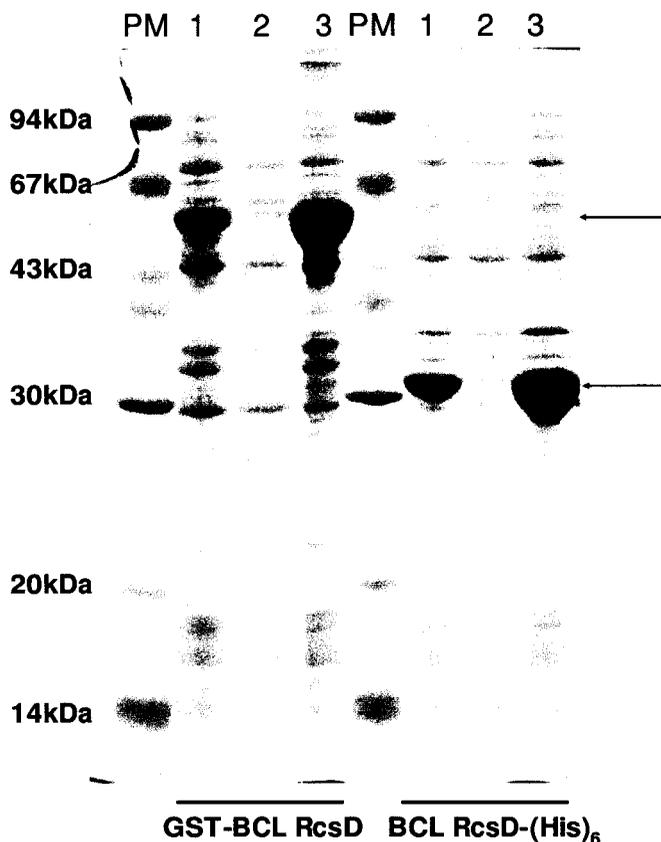


Figure 38 : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie de l'expression de la boucle périplasmique RcsD avec une étiquette GST en C-terminal (GST-BCL RcsD) ou une étiquette polyhistidine en N-terminal (BCL RcsD-(His)₆). PM, poids moléculaire. Puit 1, extrait total de protéines. Puit 2, fraction soluble des protéines. Puit 3, fraction insoluble des protéines. Les flèches représentent les protéines fortement exprimées.

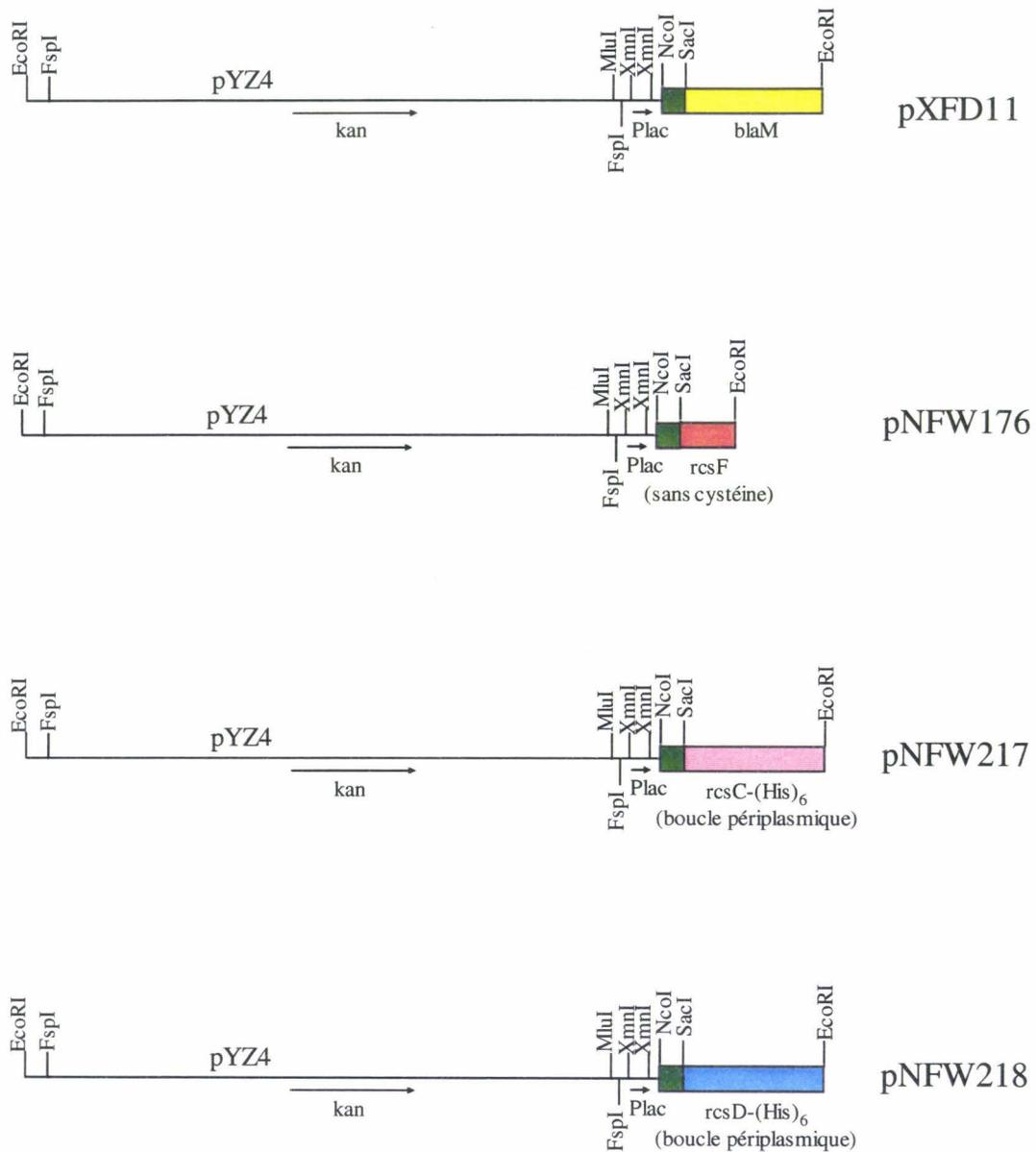
Cependant la présence de ces protéines recombinantes est uniquement observée dans les extraits totaux et dans les fractions insolubles. Ces protéines sont donc insolubles et doivent se trouver dans des corps d'inclusion. Nous avons varié les conditions de l'induction afin de diminuer l'expression : température (37°C, 30°C, 25°C ou 12°C), le temps (3 h ou la nuit). Les résultats obtenus sont les mêmes que précédemment, les protéines recombinantes se retrouvent uniquement dans la fraction insoluble.

Cette insolubilité est peut-être due à un problème de localisation cellulaire. En effet, on exprime un domaine périplasmique dans le cytoplasme ce qui pourrait causer des problèmes de mise en conformation. On peut aussi supposer que ces domaines périplasmiques nécessitent l'ancrage des deux domaines transmembranaires dans la membrane interne pour être mis en conformation.

B. L'expression périplasmique de RcsF

L'ensemble de ce travail a été effectué par Carmen Odberg. Elle a exprimé la lipoprotéine RcsF d'*E. chrysanthemi* dans le périplasma sans l'ancrage dans la membrane externe. L'ancrage dans cette membrane se fait par la présence de 3 acides gras en position N-terminale sur le premier résidu, une cystéine, de la séquence protéique mature.

Carmen Odberg a construit un vecteur contenant la séquence signal TAT d'OpgD de *Xylella fastidiosa* dans le plasmide pYZ4 sous le contrôle du promoteur PlacUV5. Ce vecteur, pXFD11, permet la sécrétion par le système TAT de diverses protéines (Figure 39). Elle a ensuite introduit dans ce vecteur, une version tronquée du gène de la lipoprotéine RcsF d'*E. chrysanthemi* codant une protéine débarrassée de sa séquence signal et du premier acide aminé de la lipoprotéine mature sur laquelle se fixe les acides gras, une cystéine (Figure 40). Ce plasmide s'appelle pNFW176 (Figure 39). Quand cette lipoprotéine soluble est exprimée dans le périplasma, la souche d'*E. coli* est fortement muqueuse indiquant une surexpression de la synthèse des exopolysaccharides. Donc la surexpression de la lipoprotéine RcsF soluble entraîne une activation du système Rcs, comme la surexpression de cette lipoprotéine ancrée dans la membrane externe (Gervais et Drapeau, 1992).



1000 pb

■ Séquence signal d'OpgD de *Xylella fastidiosa* (sécrétion par système TAT)

Figure 39 : Plasmides construits pour une expression périplasmique de RcsF, en orange (pNFW176), de la boucle périplasmique de RcsC en rose (pNFW217) et RcsD en bleu (pNFW218) à partir d'une construction du laboratoire avec *blaM* en jaune (pXFD11). En vert, est représentée la séquence signal d'OpgD de *Xylella fastidiosa*.

souche surexprimant déjà RcsF, et si une interaction se fait avec RcsF, on s'attend à une modification de la mucosité (retour à un phénotype non muqueux ou moins muqueux).

D. Expression périplasmique de la boucle périplasmique de RcsC ou RcsD avec RcsF

Pour tester une interaction entre les boucles RcsC ou RcsD et la lipoprotéine soluble RcsF dans le périplasme, nous avons construit des plasmides contenant à la fois la boucle de RcsC ou RcsD avec la partie soluble de RcsF pour éviter des différences d'expression d'une protéine par rapport à l'autre (Figure 41). Nous avons rencontré des problèmes de recombinaisons pour les deux types de constructions lorsque l'on met les deux inserts sur le même plasmide. Il fallait donc trouver une autre stratégie pour exprimer à la fois RcsF et les boucles périplasmiques de RcsC ou de RcsD. Nous avons donc essayé d'intégrer la construction de RcsF d'*E. chrysanthemi* dans le génome d'*E. coli* en monocopie grâce à un pUT mini Tn5-tet, permettant une intégration ectopique du transposon. Nous intégrerons ce transposon dans une souche sauvage et dans une souche *opgG*. Nous pourrions ensuite intégrer les plasmides déjà construits pNFW217 et pNFW218 et voir si le phénotype de mucosité varie. Cette construction sur un Tn5 a déjà été construite par Anne-France Prouvost avec une insertion dans le génome d'*E. chrysanthemi*. La souche d'*E. chrysanthemi* avec la présence de *rscF* en monocopie dans le génome possède un phénotype muqueux. Ainsi une copie supplémentaire de *rscF* suffit à induire le système Rcs. Ce travail se poursuit au laboratoire.

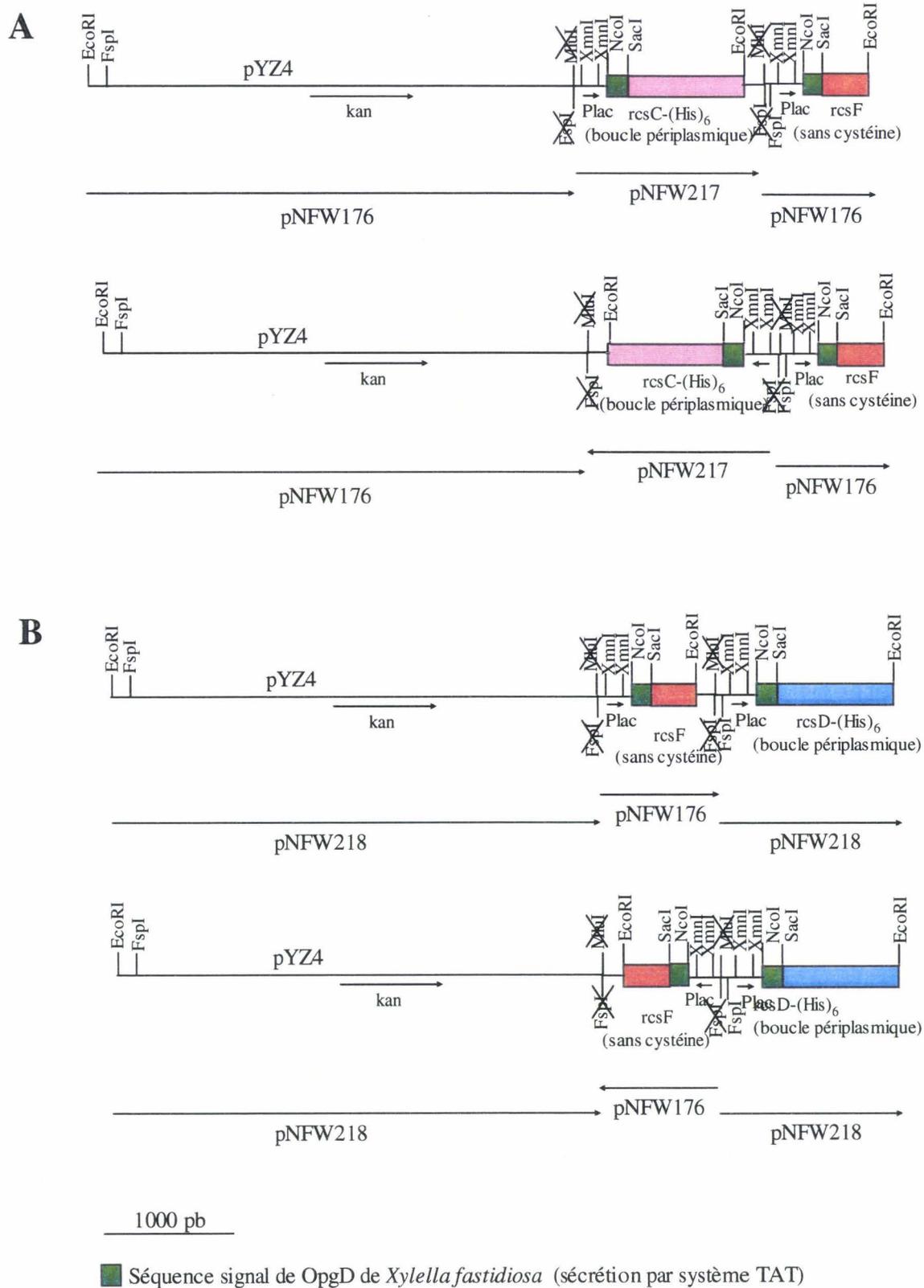


Figure 41 : Plasmides construits pour une expression périplasmique de RcsF avec la boucle périplasmique de RcsC (A) ou de RcsD (B) à partir des constructions pNF217, pNF218 et pNF176. Pour chaque construction, l'insert peut s'insérer dans les deux sens.

Discussion

Discussion

I. Les OPG

A. Perturbation du protéome en absence d'OPG : la réponse à un stress

Des mutants *opgG* chez *E. chrysanthemi* sont non virulents sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles d'endive (Page et coll., 2001). Cette perte de virulence est due à l'incapacité des mutants *opgG* à croître dans la plante hôte. Ainsi les OPG apparaissent comme un composant essentiel de l'enveloppe bactérienne nécessaire pour la virulence d'*E. chrysanthemi* et d'autres bactéries. En plus de la perte de virulence chez *E. chrysanthemi*, les mutants *opgG* ont un phénotype pléiotrope traduisant une perturbation des propriétés et des fonctions de l'enveloppe. L'analyse protéomique du mutant *opgG* a confirmé certains des phénotypes : la perte de motilité et l'excès de synthèse des exopolysaccharides. Ces résultats valident les autres analyses de cette étude protéomique. L'absence d'OPG conduit également à une augmentation de la rigidité des membranes. Ces changements visent à une protection plus importante de la bactérie par un renforcement de la structure de l'enveloppe. Cette analyse protéomique a révélé en plus que l'absence d'OPG chez *E. chrysanthemi* engendre une forte perturbation du métabolisme général de la cellule. Ce mutant montre une augmentation du catabolisme traduisant un besoin accru en énergie. Cette perturbation du métabolisme est observée chez différentes bactéries lors de la réponse à divers stress environnementaux tels que des stress osmotiques ou thermiques (Prasad et coll., 2003 ; Browne et Dowds, 2001 ; Varela et coll., 2003). On note également la surexpression de diverses protéines impliquées dans la mise en conformation et la dégradation des protéines. Cette surexpression associée à l'augmentation du besoin en énergie indique l'induction d'une réponse au stress.

Les relations entre les OPG et le système Rcs démontrées récemment nous confirment que les relations entre la bactérie et son environnement sont perturbées. L'hypothèse est qu'en absence d'OPG, la bactérie est incapable de percevoir correctement le milieu dans lequel elle se trouve. L'absence d'OPG conduit à une altération de la perception de son environnement. Un des environnements d'*E. chrysanthemi* est la plante hôte. L'absence de virulence du mutant *opgG* peut en partie s'expliquer par le fait qu'il ne reconnaît pas la plante et ainsi n'exprime pas les gènes nécessaires au bon déroulement de la virulence.

Ces résultats suggèrent que l'absence d'OPG chez *E. chrysanthemi* pourrait entraîner une activation des diverses voies impliquées dans la réponse au stress de l'enveloppe (Voir Introduction). Une relation entre les OPG et le facteur σ^E , une des voies principales du stress de l'enveloppe, a déjà été décrite (Dartigalongue et coll., 2001). En effet, la transcription des gènes *opgG* et *opgH* est régulée par le facteur σ^E (Rhodius et coll., 2006). Dans certaines conditions de stress provoquant une perturbation de l'enveloppe, la voie σ^E est activée et ainsi active la transcription des gènes *opg*. La relation entre les OPG et σ^E confirme l'importance des OPG dans la virulence car σ^E est aussi un système indispensable à la virulence des bactéries pathogènes (Raivio, 2005). Le système σ^E est principalement impliqué dans la survie dans l'hôte c'est-à-dire dans les étapes de la maladie suivant l'invasion et dans la protection contre les défenses de l'hôte. En effet, une mutation *rpoE* (gène codant σ^E) chez *S. typhimurium* diminue sa capacité à résister à la mort intracellulaire (Humphreys et coll., 1999) et chez *Mycobacterium tuberculosis*, malgré sa capacité à infecter les macrophages, cette mutation diminue sa survie dans cet environnement (Manganelli et coll., 2001). Ainsi la non virulence du mutant *opgG* n'est pas uniquement due à une modification de la composition de leur enveloppe mais aussi à une probable altération du métabolisme global de la cellule qui va conduire à une perturbation de la perception de son environnement et en particulier des interactions entre les bactéries et la plante hôte. Cette étude permet de donner un début d'explication sur le rôle des OPG dans la virulence puisque de nombreux gènes, dont l'expression est altérée chez le mutant, ont été retrouvés associés à la pathogenèse de diverses bactéries.

B. Impact de la mutation *rscC2* sur le protéome

Plusieurs mutations ponctuelles du gène *rscC* ont été décrites dans la littérature. A l'exception des mutations modifiant l'histidine phosphorylable du domaine histidine-kinase ou l'aspartate phosphorylable du domaine receveur, toutes ces mutations, que ce soit chez *E. coli* ou *S. enterica*, conduisent à une hausse du rapport RcsB phosphorylé sur RcsB non phosphorylé du régulateur. Ce phénotype se repère grâce à une baisse ou à une absence de la virulence (Garcia-Calderon et coll., 2005 ; Lazzaroni et coll., 1999 ; Majdalani et coll., 2005). Chez *E. chrysanthemi*, notre hypothèse est que l'absence d'OPG conduit à une augmentation du taux de phosphorylation de RcsB, conduisant à un phénotype déjà rencontré chez d'autres bactéries chez lesquelles RcsC hyperphosphoryle RcsB (Parker et coll., 1992 ; Shiba et coll., 2004). Cette hyperphosphorylation est une des causes de la non virulence du mutant *opgG*. En effet, seul un taux bas de phosphorylation de RcsB permet la virulence chez *S. enterica*

(García-Calderón et coll., 2005) et *E. carotovora* (Andresen et coll., 2007). Le recouvrement de la virulence du double mutant *opgG rcsC2* suggère que la mutation *rcsC2* conduit à une baisse forte du taux de phosphorylation du régulateur. La mutation *rcsC2* se situe dans la partie cytoplasmique en C-terminale de la protéine RcsC entre le segment transmembranaire et le domaine histidine kinase. Chez *E. coli*, une mutation ponctuelle dans la même région de la protéine BarA du système à 2 composants BarA/UvrY crée une perturbation de son activité kinase et une augmentation de son activité phosphatase (Tomenius et coll., 2006). Cette hypothèse est renforcée par le fait que le mutant *rcsC2* seul est hypervirulent. On peut donc imaginer que, dans un contexte *rcsC2*, l'expression des gènes participant à la virulence se rapproche, au moins en partie, de l'expression des gènes de la bactérie dans son hôte.

Une analyse protéomique de ce mutant *rcsC2* a été réalisée. Les résultats indiquent une perturbation de l'enveloppe qui concerne uniquement la rigidité des membranes mais dont on ne peut pas mesurer l'ampleur. Ces résultats ne nous ont pas permis d'expliquer les raisons de son hypervirulence. Dans cette analyse protéomique, seule l'augmentation de la voie PpsA de la néoglucogénèse paraît claire. Cette voie utilise le malate et catalyse sa transformation en pyruvate puis en phosphoénolpyruvate. Une hypothèse pourrait être que le malate, composé abondant chez les plantes, est utilisé dans le métabolisme intermédiaire par cette voie. Dans le génome d'*E. chrysanthemi*, il existe 4 systèmes putatifs de transport du malate (Bohin, communication personnelle) dont l'un est fortement similaire au système de transport du malate DctA d'*E. coli* (Davies et coll., 1999). L'induction de cette voie serait donc une réponse de la bactérie lors de l'infection de la plante. Cette voie est nécessaire à la virulence de bactéries phytopathogènes comme *Xanthomonas campestris* (Tang et coll., 2005). Elle a également un rôle dans la pathogénèse de bactéries pathogènes des animaux comme *Mycobacterium bovis* (Collins et coll., 2002) et *S. enterica* (Tchawa Yimga et coll., 2006).

C. Perspectives

Les OPG pourraient moduler le signal perçu par le système Rcs. L'hypothèse est que les OPG interagissent directement avec les protéines du système Rcs ou modulent l'interaction des protéines du système Rcs entre elles. Pour tester ces hypothèses, j'ai cloné les séquences nucléotidiques codant les boucles périplasmiques de RcsC et de RcsD et Carmen Odberg a cloné celle codant la partie périplasmique de RcsF. L'étude des interactions entre RcsC et ou RcsD avec RcsF mais aussi avec les OPG est en cours. Elle devrait participer à la clarification du rôle des OPG dans le périplasme.

Plus généralement, des études au laboratoire sont menées de façon à identifier de nouveaux systèmes à 2 composants dont l'activité serait modulée par les OPG. La recherche de suppresseurs va également être poursuivie en utilisant d'autres cribles en vue d'isoler des suppresseurs d'une seule fonction ou d'un nombre limité de fonctions et en particulier ceux qui auront retrouvés leur virulence sur plusieurs plantes hôtes.

II. Les galactanes

A. Dégradation des constituants de la pectine : utilisation des galactanes par *E. chrysanthemi*

La dégradation de la paroi des cellules végétales est assurée par la production de différentes enzymes dont les pectinases mais aussi les cellulases et les protéases. Les pectinases sont les seules à avoir un rôle indispensable dans le développement de la maladie d'*E. chrysanthemi* (Collmer et Keen, 1986). Elles sont aussi nécessaires pour libérer des sous fractions de la pectine qui seront utilisées comme source de carbone. La pectine est constituée principalement de chaînes d'HGA, de RGI et de RGII (Voir Introduction). Chez *E. chrysanthemi*, les enzymes actuellement identifiées dégradent les régions linéaires de la pectine (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1996) : les molécules HGA et le squelette des molécules de RGI (Laatu et Condemine, 2003). Lorsque nous avons débuté cette étude, aucune enzyme de dégradation des chaînes latérales de la pectine n'avait été identifiée chez *Erwinia chrysanthemi*. Nous avons caractérisé un locus, appelé *gan*, impliqué dans l'utilisation des β -1,4-galactanes, un des constituants des chaînes latérales de la pectine chez *E. chrysanthemi*. Parmi les huit gènes identifiés dans ce locus, cinq sont impliqués dans le transport. Les quatre gènes *ganE*, *ganF*, *ganG*, et *ganK* codent un des 91 systèmes de transport de type ABC putatifs annotés dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 (Bohin JP, communication personnelle). Le gène *ganL* code une porine. Les gènes *ganA* et *ganB* codent des glycosides hydrolases intervenant dans la dégradation des β -1,4-galactanes en galactose. Le dernier gène, *ganR*, code un régulateur transcriptionnel. Le locus *gan* permet à *E. chrysanthemi* d'utiliser les β -1,4-galactanes comme seule source de carbone et d'énergie pour sa croissance. L'ensemble des gènes de ce locus est conservé avec la même organisation chez *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Cette conservation suggère que différentes espèces de *Yersinia* ont aussi les capacités de transporter et cataboliser les β -1,4-galactanes. Des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques actives ont déjà été identifiées chez des Entérobactéries non phytopathogènes, comme une pectate-lyase chez *Y.*

pseudotuberculosis (Manulis et coll., 1988), une exopolygalacturonase et une pectate-lyase chez *Y. enterocolitica* (Liao et coll., 1999) et une carboxyméthylcellulase chez *Salmonella typhimurium* (Yoo et coll., 2004). Ces enzymes sont peut-être avantageuses à leur survie en tant que saprophytes avec uniquement des fonctions cataboliques pour leur nutrition. Chez *E. carotovora*, tous les gènes *gan* sont présents à l'exception de *ganR* codant le régulateur. Les gènes *gan* sont peut-être soumis à une régulation différente chez ces deux espèces.

Le gène *ganA* code une glycoside hydrolase de la famille GH53. GanA est une endo- β -1,4-galactanase périplasmique. L'enzyme purifiée catalyse *in vitro* la dégradation des galactanes en oligogalactanes de 3 à 6 résidus de galactose (gal₃ à gal₆) avec majoritairement du galactotétraose. Même après des temps prolongés d'incubation, GanA ne libère ni du galactobiose ni du galactose. L'endo- β -1,4-galactanase d'*E. chrysanthemi*, comme celle de *B. licheniformis* (Ryttersgaard et coll., 2004), n'hydrolyse pas les petits oligomères tels que les gal₂ et les gal₃. Malgré le fait que toutes les endo- β -1,4-galactanases appartiennent à la famille GH53, leur mode d'action peut être différent. En effet, l'endo- β -1,4-galactanase de *Bifidobacterium longum* libère les mêmes produits tout au long de la réaction, probablement par un mécanisme processif, avec majoritairement du gal₃ (Hinz et coll., 2005). Cependant, après des temps prolongés d'incubation, du galactose et du galactobiose sont formés. Chez *B. subtilis* et *B. longum*, l'enzyme serait processive (Hinz et coll., 2005 ; Labavitch et coll., 1976). Par contre, chez *Aspergillus aculeatus*, les produits finaux sont le galactobiose et le galactose avec des intermédiaires de plus grande taille indiquant certainement un mécanisme non processif (Christgau et coll., 1995). GanA libérant toujours les mêmes produits, on peut émettre l'hypothèse qu'elle est processive. L'enzyme resterait attachée à la chaîne de galactanes et couperait préférentiellement *in vitro* la chaîne tous les 4 résidus de galactose. La structure 3D prédite de GanA d'*E. chrysanthemi* posséderait un centre catalytique en forme de tunnel comme celle des autres galactanases de bactéries ou de champignons. La processivité d'une enzyme endoglycolytique a déjà été décrite chez les cellobiohydrolases. Chez ces enzymes, la processivité semble liée à la structure en forme de tunnel avec les résidus catalytiques dans le sillon. (Von Ossowski et coll., 2003 ; Boisset et coll., 2000). La spécificité du substrat sur l'enzyme se fait grâce aux acides aminés d'un site catalytique, c'est-à-dire, grâce aux résidus catalytiques et aux sites de reconnaissance et de fixation situés à la surface du sillon. Cet ensemble définit la taille des oligosaccharides formés. Dans notre cas, même si c'est l'hypothèse la plus probable, la structure ne permet pas d'appuyer l'hypothèse de la processivité car la structure 3D de l'endogalactanase d'*A. aculeatus*, non

processive, est la même que celle de *B. licheniformis*, processive. Plusieurs localisations sont observées pour les endo- β -1,4-galactanases. Une localisation extracellulaire permet à l'endo- β -1,4-galactanase de dégrader directement les galactanes liés à la pectine, comme pour les enzymes d'*Aspergillus niger*, de *B. subtilis* et de *Pseudomonas fluorescens* (De Vries et coll., 2002 ; Shipkowski et Brenchley, 2006. ; Braithwaite et coll., 1997). Chez *B. longum*, cette enzyme est extracellulaire mais ancrée dans le membrane (Hinz et coll., 2005) ce qui la rapproche fort de celle d'*E. chrysanthemi* qui est périplasmique. Dans ce cas, le substrat ne pourra être utilisé que si d'autres enzymes libèrent les galactanes de la pectine, qui peuvent ensuite accéder à la cellule. Dans le cas d'*E. chrysanthemi*, ces autres enzymes sont les pectinases synthétisées par la bactérie elle-même. Dans d'autres cas, la bactérie peut être dépendante d'enzymes extracellulaires d'autres espèces partageant le même écosystème. Par exemple, l' α -amylase périplasmique d'*E. coli* catalysant la dégradation des maltodextrines en maltotriose, maltose et glucose, joue un rôle analogue à GanA dans l'utilisation des maltodextrines (Freundlieb et Boos, 1986) mais ne possède pas d'exoenzymes capables de dégrader l'amidon en maltodextrines. L'utilisation des maltodextrines dépend donc de la dégradation de cet amidon par des exoenzymes produites par d'autres espèces. La localisation périplasmique de GanA chez *E. chrysanthemi* implique un système de transport relativement complexe mais peut présenter un avantage car elle dégrade les galactanes uniquement pour sa propre utilisation. Une localisation extracellulaire entraînerait une dégradation directe des galactanes en oligosaccharides disponibles pour d'autres bactéries se trouvant aux alentours mais ne l'obligerait pas à avoir un système de transport aussi sophistiqué.

Le gène *ganB* code une glycoside hydrolase de la famille GH42. GanB est une enzyme cytoplasmique à activité exogalactanase ou β -galactosidase. *E. chrysanthemi* possède deux β -galactosidases codées par les gènes *lacZ* et *ganB* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Robert-Baudouy, 1985). GanB possède l'activité principale. Cette enzyme permet de dégrader les oligogalactanes en galactose pour son entrée dans le métabolisme. LacZ n'a pas de fonction dans l'utilisation des galactanes. Les endogalactanases, qui sont incapables de produire du galactose comme produit final, nécessitent d'être associées à une exogalactanase. Comme c'est le cas chez *B. subtilis*, on devrait retrouver un gène codant une endogalactanase de la famille GH53 associé à un gène codant une β -galactosidase de la famille GH42 chez toutes les espèces possédant une endogalactanase processive ne libérant pas de galactose (Shipkowski et Brenchley, 2006).

Dans le génome, en amont et en aval des gènes *ganA* et *ganB*, on retrouve d' autres gènes qui participeraient au transport des galactanes. Notre étude nous a permis de construire un modèle pour le transport et le catabolisme des galactanes (Figure 42). Les galactanes sont libérés après digestion de la pectine par une série d'enzymes pectinolytiques produites par *E. chrysanthemi*. Ces chaînes de galactanes diffusent à travers la membrane externe par la porine GanL. La porine GanL a été annotée LamB (Babujee et coll., 2007), mais cette annotation n'est pas appropriée car *E. chrysanthemi* n'est pas sensible au phage λ et elle est surtout incapable d'utiliser le maltose et les maltodextrines comme source de carbone pour sa croissance. GanL est une porine spécifique des galactanes puisqu'un mutant *ganL* ne croît pas sur les galactanes, comme seule source de carbone. De plus, ces mutants ont un rendement de croissance sur les oligogalactanes produits par GanA d'environ 20 % comparé à la souche sauvage (Tableau 11). Ces 20 % correspondent approximativement au pourcentage de gal₃ présents dans ce mélange. Ainsi ces gal₃ sont probablement capables de diffuser à travers une porine non spécifique. Le modèle postule que GanA capture les galactanes au cours de leur entrée par GanL et les clive dans le périplasma, de manière processive, en oligosaccharides de 3 résidus de galactose. En effet, un mutant *ganA* est incapable de croître sur les galactanes. Par contre il présente un rendement de croissance de moins de 20 % sur les oligogalactanes produits par GanA *in vitro*. On peut penser que, chez un mutant *ganA*, seuls les gal₃ sont utilisés pour la croissance. *In vitro*, GanA produit préférentiellement des gal₄ mais *in vivo*, les produits libérés seraient des gal₃. Ces gal₃ seraient directement pris en charge par GanE, la protéine affine périplasmique qui les amènent au complexe GanFGK₂, permettant le transport à travers la membrane interne. Les mutants *ganE* et *ganK* ne peuvent croître ni sur galactanes ni sur un mélange d'oligogalactanes (gal₃ à gal₆) produit par l'action de GanA *in vitro*. Une fois le galactotriose dans le cytoplasme, l'enzyme cytoplasmique GanB les dégrade en galactose, seul produit rentrant dans le métabolisme.

L'expression de gènes *gan* est contrôlée par la phase de croissance (induction en phase stationnaire) et par CRP (soumis à la répression catabolique) comme de nombreuses enzymes pectinolytiques (Hugouvieux-Cotte-Pattat et coll., 1992 ; Bourson et coll., 1993). Ces gènes sont également contrôlés par un régulateur spécifique, GanR. Une mutation dans *ganR* diminue l'expression des gènes *gan*. Malgré le fait que GanR appartient à la famille des répresseurs de type LacI, il semble agir comme activateur de l'expression des gènes *gan*. Cependant le niveau d'expression des gènes *gan* est élevé dans toutes les conditions testées et l'effet de l'activation par GanR est faible. De plus l'analyse protéomique faite durant mon

travail de thèse montre un haut niveau de GanA après croissance en milieu LB de la souche d'*E. chrysanthemi* 3937 (Bouchart et coll., 2007). Cette forte expression de GanA est également retrouvée lors d'une analyse protéomique après culture en milieu 63 (Babujee et coll., 2007). Nous ne pouvons pas exclure que l'expression des gènes *gan* présente une dérégulation dans la souche d'*E. chrysanthemi* 3937.

Des mutants *gan* d'*E. chrysanthemi* montrent une croissance et une macération normale sur feuilles d'endive, tubercules de pomme de terre et *Saintpaulia ionantha*. Les gènes *gan* sont bien exprimés pendant l'infection mais leur expression n'est pas essentielle pour la virulence d'*E. chrysanthemi*. Seule la dégradation de la pectine est indispensable à la virulence parce qu'elle provoque la macération du tissu (Sepulchre et coll., 2007). En effet, la dégradation des autres polymères de la paroi, tels que la cellulose et les xylanes (hémicellulose), n'est pas indispensable à la virulence (Boccaro et coll., 1994, Keen et coll., 1996). La dégradation de la pectine permet probablement la déstructuration de la paroi qui rend accessible les autres constituants de cette paroi et permet de libérer des sous fractions de la pectine comme les galactanes. Au cours du processus infectieux, lorsque la maladie est bien établie, la cellulose et l'hémicellulose sont probablement utilisées comme nutriment. Les galactanes, eux, pourraient être utilisés dans un second temps, ce qui expliquerait l'expression plus abondante des gènes *gan* en phase stationnaire.

B. Perspectives

Les galactanes et les galacto-oligosaccharides sont des fibres diététiques à potentiel prébiotique (Rabiu et coll., 2001 ; Rycroft et coll., 2001) ; des produits commerciaux les contenant sont disponibles. Un prébiotique est défini comme un ingrédient alimentaire non digestible ayant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon qui a le potentiel d'améliorer la santé de l'hôte. Ces bactéries sont généralement du genre *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* (O'Sullivan, 2001). Le système d'utilisation des galactanes par *B. longum* a été identifié (Hinz et coll., 2005). Des endo-galactanases putatives, avec un haut pourcentage d'identité avec GanA d'*E. chrysanthemi*, sont également présentes chez des bactéries pathogènes comme les *Yersinia*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*... Ainsi l'étude de ce système et des enzymes de dégradation dans d'autres organismes permettrait de comprendre la digestion des galactanes dans l'intestin et de déterminer quels organismes et quelles enzymes sont impliquées dans l'utilisation des galactanes comme prébiotiques.

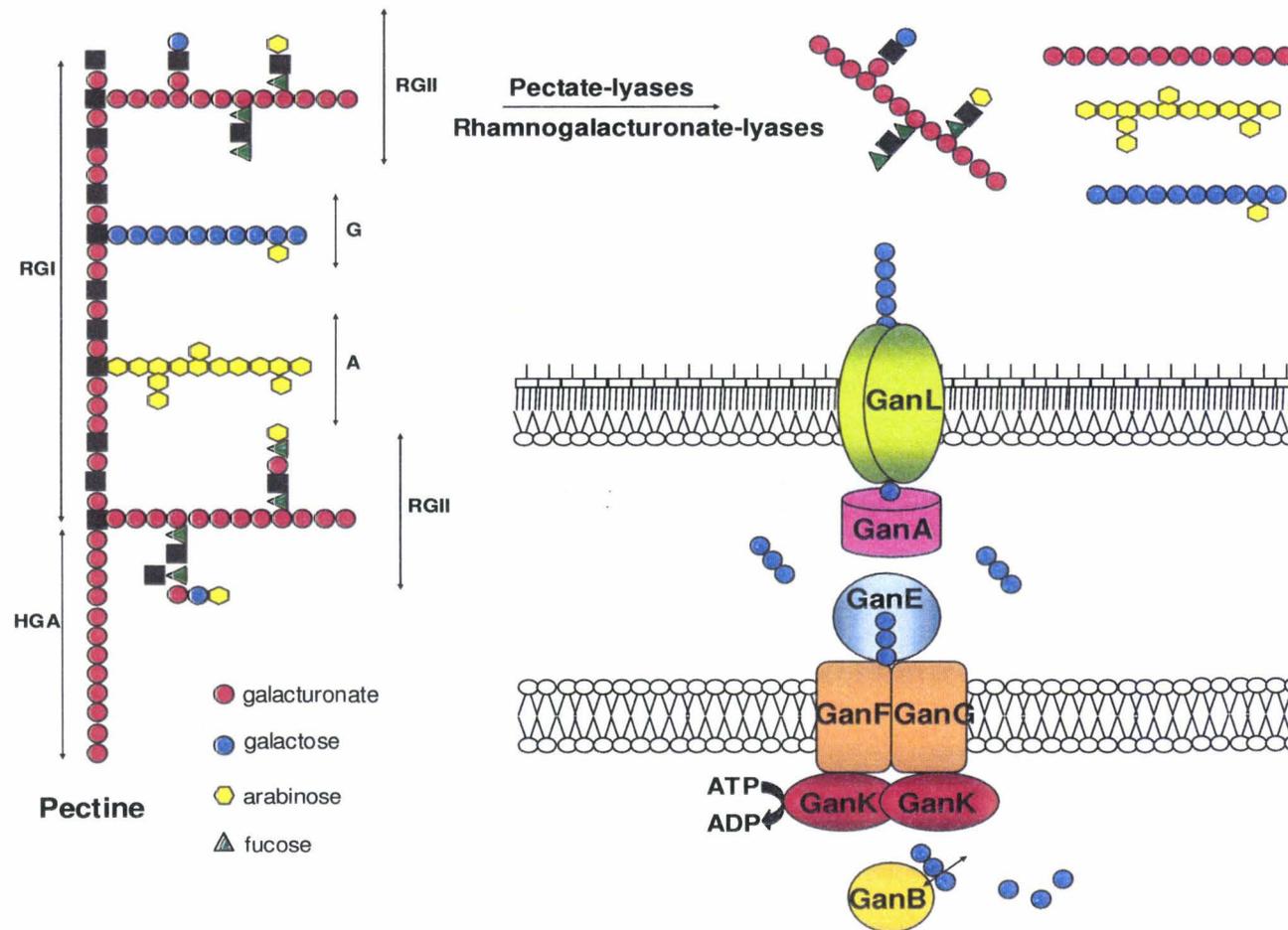


Figure 42 : Représentation schématique chez *E. chrysanthemi* du système *gan* impliqué dans le transport et le catabolisme des galactanes, un des composants de la pectine. Après l'action d'enzymes pectinolytiques, les galactanes (G) libérés traversent la membrane externe par la porine GanL, sont dégradés dans le périplasma par GanA en galactotriose puis pris en charge par la protéine affine GanE qui amène ces oligomères au système de transport de type ABC, GanEFGK₂. Ces oligomères sont ensuite dégradés dans le cytoplasme en galactose.

Références

Références

- Ames GFL, Prody C and Kustu S. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroforme. *J. Bacteriol.* 160:1181-1183.
- Andresen L, Kõiv V, Alamäe T and Mäe A. 2007. The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*. *FEMS Microbiol Lett.* [Epub ahead of print].
- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I and Gorvel JP. 2005. Cyclic β 1-2 glucan is a *Brucella* virulence factor for intracellular survival. *Nat. Imm.* 6:618-625.
- Avarind L and Ponting CP. 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 176:111-116.
- Aymeric JL, Guiseppi A, Pascal MC and Chippaux M. 1988. Mapping and regulation of the *cel* genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Gen Genet.* 211:95-101.
- Babujee L, Venkatesh B, Yamazaki A et Tsuyumu S. 2007. Proteomic analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) strain 3937. *J Proteome Res.* 6: 62-69.
- Behari J, Stagon L and Calderwood SB. 2001. *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 183:178-188.
- Bendtsen JD, Henrik N, von Heijne G and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-795.
- Bereswill S and Geider K. 1997. Characterization of the *rcsB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *J Bacteriol.* 179:1354-1361.
- Blot N, Berrier C, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Ghazi A and Condemine G. 2002. The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family. *J Biol Chem.* 277:7936-7944.
- Boccardo M, Aymeric JL and Camus C. 1994. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J Bacteriol.* 176:1524-1526.
- Bohin A, Bouchart F, Richet C, Kol O, Leroy Y, Timmerman P, Huet G, Bohin JP and Zanetta JP. 2005. GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives. *Anal. Biochem.* 340: 231-244.
- Bohin JP and Lacroix JM. 2006. Osmoregulation in the periplasm. In *The Periplasm*, pp 325-341. Edited by M. Ehrmann. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bohin JP. 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 186:11-19.
- Boisset C, Fraschini C, Schulein M, Henrissat B and Chanzy H. 2000. Imaging the

enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1444-1452.

Bouchart F, Delangle A, Lemoine J, Bohin JP and Lacroix JM. 2007. Proteomic analysis of a non virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology.* 153: 760-767.

Bouchart F. 2006. Impact des mutations *opg* chez *Erwinia chrysanthemi* : recherche de suppresseurs et analyse protéomique des mutants. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.

Bourson C, Favey S, Reverchon Sand Robert-Baudouy J. 1993. Regulation of the expression of a *pelA::uidA* fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis. *J. Gen. Microbiol.* 139:1-9.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Braithwaite KL, Barna T, Spurway TD, Charnock SJ, Black GW, Hughes N, Lakey JH, Virden R, Hazlewood GP, Henrissat B and Gilbert HJ. 1997. Evidence that galactanase A from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* is a retaining family 53 glycosyl hydrolase in which E161 and E270 are the catalytic residues. *Biochemistry.* 49:15489-15500.

Breedveld MW and Miller KJ. 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol Rev.* 58:145-161.

Brencic A and Winans SC. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69:155-194.

Browne N and Dowds BCA. 2001. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol.* 91:1085-1094.

Cai SJ and Inouye M. 2003. Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* histidine kinase (EnvZ). *J Mol Biol.* 329:495-503.

Cano DA, Dominguez-Bernal G, Tierrez A, Garcia del Portillo F and Casades J. 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics.* 162:1513-1523.

Carballes F, Bertrand C, Bouche JP and Cam K. 1999. Regulation of *Escherichia coli* *ftsA* and *ftsZ* by two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol.* 34:442-450.

Carballes F, Bertrand C, Bouche JP and Cam K. 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol.* 34:442-450.

Castanié-Cornet MP, Cam K and Jacq A. 2006. RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188:4264-4270.

- Castillo A and Reverchon S.** 1997. Characterization of the *pecT* control region from *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol.* 179:4909-4918.
- Cayley DS, Guttman HJ and Record Jr MT.** 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.
- Christgau S, Sandal T, Kofod LV and Dalboge H.** 1995. Expression cloning, purification and characterization of a beta-1,4-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Curr. Genet.* 27:135-141.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PROC Natl Acad Sci USA.* 86:2172-2175.
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH and Engleberg NC.** 1990. A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis.* 162:121-126.
- Clarke DJ, Holland IB and Jacq A.** 1997. Point mutations in the transmembrane domain of DjlA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Rcs signal transduction pathway. *Mol Microbiol.* 25:933-944.
- Cogez V, Talaga P, Lemoine J and Bohin JP.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* 183, 3127-33.
- Collins DM, Wilson T, Campbell S, Buddle BM, Wards BJ, Hotter G and De Lisle GW.** 2002. Production of avirulent mutants of *Mycobacterium bovis* with vaccine properties by the use of illegitimate recombination and screening of stationary-phase cultures. *Microbiology.* 148:3019-3027.
- Collmer A and Bateman DF.** 1981. Impaired induction and self-catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutants deficient in oligogalacturonide lyase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:3920-3924.
- Collmer A and Keen NT.** 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 24:383-409.
- Condemine G and Robert-Baudouy.** 1987. 2-keto-3-deoxygluconate transport system in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol.* 169:1972-1978.
- Cui Y, Chatterjee A and Chatterjee AK.** 2001. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory *rsmB* RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:516-526.
- Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK and Chatterjee AK.** 1995. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J. Bacteriol. Sep;*177:5108-5115.
- Danese PN and Silhavy TJ.** 1998. CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol.* 180:831-839.

- Danese PN, Snyder WB, Cosma CL, Davis LJ and Silhavy TJ.** 1995. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* 9:387-398.
- Dartigalongue C, Missiakas D and Raina S.** 2001. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem.* 276:20866-20875.
- Davies SJ, Golby P, Omrani D, Broad SA, Harrington VL, Guest JR, Kelly DJ and Andrews SC.** 1999. Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:5624-5635.
- Davis MS, Solbiata J and Cronan JE.** 2000. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 275:28593-28598.
- Davis RW, Botstein D and Roth JR.** 1980. A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- de Iannino NI, Briones G, Iannino F and Ugalde RA.** 2000. Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology.* 146:1735-1742.
- De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U and Timmis KN.** 1990. mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol.* 172:6568-6572.
- De Mot R and Vanderleyden J.** 1994. The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol Microbiol.* 12:333-334.
- De Vries RP, Parenicova L, Hinz SWA, Kester HCM, Beldman G, Benen JAE and Visser J.** 2002. The β -1,4-endogalactanase A from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.* 269:4985-4993.
- De Wulf P, McGuire AM, Liu X and Lin EC.** 2002. Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 277:26652-26661.
- Debarbieux L, Bohin A and Bohin JP.** 1997. Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179:6692-6698.
- Delepelaire P and Wandersman C.** 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol.* 5:2427-2434.
- Delepelaire P.** 1994. PrtD, the integral membrane ATP-binding cassette component of the *Erwinia chrysanthemi* metalloprotease secretion system, exhibits a secretion signal-regulated ATPase activity. *J Biol Chem.* 269:27952-27957.
- DeMartini M and Inouye M.** 1978. Interaction between two major outer membrane proteins of *Escherichia coli*: the matrix protein and the lipoprotein. *J Bacteriol.* 133:329-335.

- Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, Mogk A and Bukau B.** 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*. 400:693-696.
- Dunlap J, Minami E, Bhagwat AA, Keister DL and Stacey G.** 1996. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic B-glucan synthesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 9:546-555.
- Dutta R and Inouye M.** 1996. Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase-phosphatase+ mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271:1424-1429.
- Dye DW.** 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The amylovora group. *N. Z. J. Sci.* 11: 590-607.
- Dye DW.** 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The carotovora group. *N. Z. J. Sci.* 12: 81-97.
- Dye DW.** 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. III. The herbicola group. *N. Z. J. Sci.* 12: 223-236.
- Dye DW.** 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. IV. "Atypical" erwinias. *N. Z. J. Sci.* 12: 833-839.
- Ebel W, Vaughn GJ, Peters III HK and Trempey JE.** 1997. Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179:6858-6881.
- Eriksson AR, Andersson RA, Pirhonen M and Palva ET.** 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11:743-752.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M and Hinton JC.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 47:103-118.
- Farris M, Grant A, Richardson TB and O'Connor CD.** 1998. BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 28:265-279.
- Fiedler W and Rotering H.** 1985. Characterization of an *Escherichia coli mdoB* mutant strain unable to transfer sn-1-phosphoglycerol to membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem.* 260:4799-4806.
- Fiedler W and Rotering H.** 1988. Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem.* 263:14684-14689.
- Flego D, Marits R, Eriksson AR, Koiv V, Karlsson MB, Heikinheimo R and Palva ET.** 2000. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the pathogen *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* 13:447-455.
- Francez-Charlot A, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C and Cam K.** 2005. Osmotic regulation of the *Escherichia coli bdm* (Biofilm-Dependant Modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol.* 187:3873-3877.

- Francez-Charlot A, Laugel B, Van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C and Cam K.** 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates flhDC operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 49:823-832.
- Franza T, Sauvage C and Expert D.** 1999. Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:119-128.
- Freundlieb S and Boos W.** 1986. α -amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, *malS*, and identification of its products as a periplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 261:2946-2953.
- García-Calderón CB, García-Quintanilla M, Casadesús J and Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology.* 151:579-588.
- Gelfand MS and Laikova ON.** 2003. Prolegomena to the evolution of transcriptional regulation in bacterial genomes. In E. V. Kooning, and M. Y. Galperin (ed.), *Frontiers in computational Genomics.* Wymondham, Caister Academic Press. p195-216.
- Geremia RA, Cavaignac S, Zorreguieta A, Toro N, Olivares J and Ugalde RA.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan. *J Bacteriol.* 169:880-884.
- Gervais FG and Drapeau GR.** 1992. Identification, cloning, and characterization of *rscF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation *ftsZ84* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 174:8016-8022.
- Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS and Lory S.** 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell.* 2004 7:745-754.
- Gottesman S and Stout V.** 1991. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol.* 5:1599-1606.
- Gottesman S, Trisler P and Torres-Cabassa A.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol.* 162:1111-1119.
- Gout E, Bligny R, Pascal N and Douce R.** 1993. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells. *J Biol Chem.* 268:3986-3992.
- Grant AJ, Farris M, Alefounder P, Williams PH, Woodward MJ and O'Connor CD.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol.* 48:507-521.
- Grenier AM, Duport G, Pages S, Condemine G and Rahbe Y.** 2006. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl Environ Microbiol.* 72:1956-1965.
- Grigorova IL, Chaba R, Zhong HJ, Alba BM, Rhodius V, Herman C and Gross CA.** 2004. Fine-tuning of the *Escherichia coli* sigmaE envelope stress response relies on multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti-sigma factor, RseA. *Genes Dev.* 18:2686-2697.

Grodberg J and Dunn JJ. 1988. OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* 170:1245-1253.

Hall MN and Silhavy TJ. 1981. Genetic analysis of the *ompB* locus of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol.* 151:1-15.

Hansen EJ and Juni E. 1975. Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking NAD- and NADP-linked malic. *Biochem Biophys Res Commun.* 65:559-566.

Harris SJ, Shih YL, Bentley SD and Salmond GP. 1998. The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol Microbiol.* 28:705-717.

Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J and Verdonck L, Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* 21: 384-97.

Heeb S and Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:1351-1363.

Henrissat B and Bairoch A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293:781-788.

Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.

Hinz SW, Pastink MI, Van den Broek LA, Vincken JP and Voragen AG. 2005. *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5501-5510.

Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, Hirata T and Yamaguchi A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 55:1113-1126.

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

Hoch JA. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* 3:165-170.

Hoffmann F, Weber J and Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 2002. 80:313-319.

Horne SM, Kottom TJ, Nolan LK and Young KD. 1997. Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella typhimurium*. *Infect immun.* 65:806-810.

<http://www.cazy.org/index.html>

Hugouvieux-Cotte-Pattat N and Reverchon S. 2001. Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol.* 41:1125-32.

Hugouvieux-Cotte-Pattat N and Robert-Baudouy J. 1985. Lactose metabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol.* 162:248-255.

- Hugouvieux-Cotte-Pattat N and Robert-Baudouy J.** 1987. Hexuronate catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol.* 169:1223-1231.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Blot N and Reverchon S.** 2001. Identification of TogMNAB, an ABC transporter which mediates the uptake of pectic oligomers in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol.* 41:1113-1123.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W and Reverchon S.** 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol.* 50:213-257.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Dominguez H and Robert-Baudouy J.** 1992. Environmental conditions affect the transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol.* 174:7807-7818.
- Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, Anjum MF, Woodward MJ, Gilbert S, Kormanec J and Roberts M.** 2004. Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *Infect Immun.* 72:4654-4661.
- Humphreys S, Stevenson A, Bacon A, Weinhardt AB and Roberts M.** 1999. The alternative sigma factor, σ^E , is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 67:1560-1568.
- Hwang J, Pyun YR and Kokini JL.** 1993. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocolloids* 7: 39-53.
- Hyttiäinen H, Sjöblom S, Palomäki T, Tuikkala A and Palva ET.** 2003. The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*. *Mol Microbiol.* 50:795-807.
- Kaspar S and Bott M.** 2002. The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escheichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor. *Arch Microbiol.* 177:313-321.
- Kaspar S, Perrozo S, Reinelt S, Meyer M, Pfister K, Scapozza L and Bott M.** 1999. The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol.* 33:858-872.
- Kazemi-Pour N, Condemine G and Hugouvieux-Cotte-Pattat N.** 2004. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics.* 4:3177-3186.
- Keen NT, Boyd C and Henrissat B.** 1996. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:651-657.
- Keen NT, Ridgway D and Boyd C.** 1992. Cloning and characterization of a phospholipase gene from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Mol Microbiol.* 6:179-187.
- Kennedy EP.** 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 EP.** 1996. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic β -D-glucans) of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Microbiology*, 2nd edn:1064-1074.

- Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M and Karp PD.** 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. Nucl. Acid Res. 33:334-337.
- Kitten T, Kinscherf TG, McEvoy JL and Willis DK.** 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. Mol Microbiol. 28:917-929.
- Kolmar H, Waller PR and Sauer RT.** 1996. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. J Bacteriol. 178:5925-5929.
- Laatu M and Condemine G.** 2003. Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the *out* system in *Erwinia chrysanthemi*. J Bacteriol. 185:1642-1649.
- Labavitch JM, Freeman LE and Albersheim P.** 1976. Structure of plant cell wall: Purification and characterization of a β -1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. J Biol Chem. 251:5904-5910.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-684.
- Lazzaroni JC, Germon P, Ray MC and Vianney A.** 1999. The Tol proteins in *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membranes stability. FEMS Microbiol Lett. 177 :191-197.
- Lequette Y, Odberg-Ferragut C, Bohin JP and Lacroix JM.** 2004. Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. J Bacteriol. 186:3695-3702.
- 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.
- Liao CH, Revear L, Hotchkiss A and Savary B.** 1999. Genetic and biochemical characterization of exopolygalacturonase and a pectate lyase from *Yersinia enterocolitica*. Can J Microbiol. 45:396-403.
- Liu Y, Murata H, Chatterjee A and Chatterjee AK.** 1993. Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact. 6:299-308
- Llama-Palacios A, Lopez-Solanilla E, Poza-Carrion C, Garcia-Olmedo F and Rodriguez-Palenzuela P.** 2003. The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. Mol Microbiol. 49:347-357.
- Loubens I, Debarbieux L, Bohin A, Lacroix JM and Bohin JP.** 1993. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. Mol Microbiol. 10:329-340.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Macnab RM.** 1999. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol.* 181:7149-53.
- Madjalani N, Hernandez D and Gottesman S.** 2002. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol.* 46:813-826.
- Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG and Ausubel FM.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 96:47-56.
- Mahé B, Masclaux C, Rauscher L, Enard C and Expert D.** 1995. Differential expression of two siderophore-dependent iron-acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Mol Microbiol.* 18:33-43.
- Majdalani N and Gottesman S.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol.* 59:379-405.
- Majdalani N, Heck M, Stout V and Gottesman S.** 2005. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187:6770-6778.
- Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK and Smith I.** 2001. The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol.* 41:423-437.
- Manulis S, Kobayashi DY and Keen NT.** 1988. Molecular cloning and sequencing of a pectate lyase gene from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* 170:1825-1830.
- Matsumoto H, Jitareerat P, Baba Y and Tsuyumu S.** 2003. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:226-237.
- Mc Carter JD and Withers SG.** 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol.* 4: 885-892.
- McCulloch R, Burke ME and Sherratt DJ.** 1994. Peptidase activity of *Escherichia coli* aminopeptidase A is not required for its role in Xer site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1994 Apr;12(2):241-51.
- McGowan S, Sebahia M, Jones S, Yu B, Bainton N, Chan PF, Bycroft B, Stewart GS, Williams P and Salmond GP.** 1995. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology.* 141:541-550.
- Miller JH.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Minsavage GV, Mudgett MB, Stall RE and Jones JB.** 2004. Importance of *opgH_{Xcv}* of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in host-parasite interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:152-161.
- Mizuno T and Mizushima S.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol.* 4:1077-1082.

- Molestina RE, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramirez JA and Summersgill JT.** 2002. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEP-2 cells. *Infect Immun.* 70:2976-2981.
- Monnet V.** 2003. Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 60:2100-2114.
- Moulard M, Condemine G and Robert-Baudouy J.** 1993. Characterization of the *nucM* gene coding for a nuclease of the phytopathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol.* 8:685-695.
- Mousslim C and Groisman EA.** 2003. Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol.* 47:335-344.
- Mousslim C, Delgado M and Groisman EA.** 2004. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol.* 54:386-395.
- Mukherjee A, Cui Y, Ma W, Liu Y and Chatterjee AK.** 2000. *hexA* of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strain Ecc71 negatively regulates production of RpoS and *rsmB* RNA, a global regulator of extracellular proteins, plant virulence and the quorum-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Environ Microbiol.* 2:203-215.
- Muyerowitz EM and Somerville CR.** 1994. *Arabidopsis*. Cold spring harbor laboratory press.
- Narita S and Tokuda H.** 2006. An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett.* 580:1164-1170.
- Nasser W, Brouillant ML, Salmond GPC and Reverchon S.** 1998. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol.* 29:1391-1405.
- Neidhardt FC, Ingraham JL and Schaechter M.** 1993. Les voies d'approvisionnement dans le livre « physiologie de la cellule bactérienne ». Traduit par Bohin JP.
- Neiditch MB, Federle MJ, Miller ST, Bassler BL and Hughson FM.** 2005. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell.* 18:507-518.
- Nevesinjac AZ and Raivio.** 2005. The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187:672-686.
- Nikaido H and Vaara M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 49:1-32.
- Nomura K, Nasser W, Kawagishi H and Tsuyumu S.** 1998. The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14034-14039.
- Osteras M, O'Brien SA and Finan TM.** 1997. Genetic analysis of mutations affecting *pckA* regulation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics.* 147:1521-1531.
- O'Sullivan DJ.** 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 49:1751-1760.
- Otto K and Silhavy TJ.** 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2287-2292.

- Page F, Altabe S, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Lacroix JM, Robert-Baudouy J and Bohin JP.** 2001. Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J Bacteriol.* 183:3134-3141.
- Page F.** 2003. Les glucanes périplasmiques osmorégulés d'*Erwinia chrysanthemi* et *Escherichia coli* : relation avec la phytopathogénicité et régulation génétique de la biosynthèse. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Pappalardo J, Janausch IG, Vijayan V, Zientz E, Junker, Peti W, Zweckstetter M, Unden G and Griesinger C.** 2003. The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 278:39185-39188.
- Parker CT, Kloser AW, Schnaitman CA, Stein MA, Gottesman S and Gibson BW.** 1992. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174:2525-2538.
- Parkinson JS.** 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* 73:857-871.
- Pernestig AK, Georgellis D, Romeo T, Suzuki K, Tomenius H, Normark S, Melefors O.** 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* 185:843-853.
- Pérombelon MCM and Kelman A.** 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Ann Rev Phytopathol.* 18:361-387.
- Prailet T, Reverchon S, Robert-Baudouy J and Nasser W.** 1997. The PecM protein is necessary for the DNA-binding capacity of the PecS repressor, one of the regulators of the virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol letters.* 154:265-270.
- Prasad J, McJarrow P and Gopal V.** 2003. Heat and osmotic stress response of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* 69:917-925.
- Pugsley AP.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57:50-108.
- Puvanesarajah V, Schell FM, Stacey G, Douglas CJ and Nester EW.** 1985. Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 164:102-106.
- Rabilloud, T.** 1999. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods. Mol. Biol.* 112: 297-305.
- Rabiu BA, Jay AJ, Gibson GR and Rastall RA.** 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium species*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2526-2530.
- Raetz CRH.** 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* 20: 253-295.
- Raffa RG and Raivio TL.** 2002. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45:1599-1611.

- Raivio TL and Silhavy TJ.** 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* 55:591-624.
- Raivio TL, Laird MW, Joly JC and Silhavy TJ.** 2000. Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the cpx envelope stress response. *Mol Microbiol.* 37:1186-1197.
- Raivio TL, Popkin DL and Silhavy TJ.** 1999. The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol.* 181:5263-5272.
- Raivio TL.** 2005. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* 56:1119-1128.
- Raivio TL.** 2006. The Cpx envelope stress response. In *The Periplasm*, pp 83-106. Edited by M. Ehrmann. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Rantakari A, Virtaharju O, Vahamiko S, Taira S, Palva ET, Saarilahti HT and Romantschuk M.** 2001. Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: partial characterization of the hrp gene cluster. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:962-928.
- Reiser V, Raitt DC and Saito H.** 2003. Yeast osmosensor SlnI and plant cytokinin receptor CreI respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol.* 161:1035-1040.
- Reverchon S, Expert D, Robert-Baudouy J and Nasser W.** 1997. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol.* 179:3500-3508.
- Reverchon S, Nasser W and Robert-Baudouy J.** 1991. Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol Microbiol.* 5:2203-2216.
- Reverchon S, Nasser W and Robert-Baudouy J.** 1994. *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol.* 11:1127-1139.
- Rhodium VA, Suh WC, Nonaka G, West J and Gross CA.** 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol.* 4:e2.
- Richarme G and Caldas TD.** 1997. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J Biol Chem.* 272:15607-15612.
- Rollet E.** 2006. 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*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Romeo T and Snoep JL.** 2005. : in Neidhardt FC, Bock A, Curtis III R, Kaper JB, Nyström T, Rudd KE and Squires CL (Ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, www.ecosal.org. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Romeo T, Gong M, Liu MY and Brun-Zinkernagel AM.** 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol.* 175: 4744-4755.

- Romeo T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* 29:1321-1330.
- Russel M.** 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol.* 279:485-499.
- Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall RA.** 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91:878-887.
- Ryttersgaard C, Le Nours J, Lo Leggio L, Jorgensen CT, Christensen LL, Bjornvad M and Larsen S.** 2004. The structure of endo-beta-1,4-galactanase from *Bacillus licheniformis* in complex with two oligosaccharide products. *J Mol Biol.* 341:107-117.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L.** 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 1415-27.
- San Francisco MJ and Keenan RW.** 1993. Uptake of galacturonic acid in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J Bacteriol.* 175:4263-4265.
- Sanchez B, Champomier-Verges MC, Anglade P, Baraige F, de Los Reyes-Gavilan CG, Margolles A and Zagorec M.** 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol.* 187:5799-5808.
- Santos R, Franza T, Laporte ML, Rumley MK and Kennedy EP.** 2001. Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol Plant-Microbe Interact.* 6:758-767.
- Sato T, Ito K and Yura T.** 1977. Membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes. *Eur J Biochem.* 78:557-567.
- Sepulchre JA, Reverchon S and Nasser W.** 2007. Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J. Theor. Biol.* 244:239-257.
- Shevchik VE and Hugouvieux-Cotte-Pattat N.** 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol.* 24:1285-1301.
- Shevchik VE, Condemine G, Hugouvieux-Cotte-Pattat N and Robert-Baudouy J.** 1996. Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol.* 19:455-466.
- Shiba Y, Matsumoto K and Hara H.** 2006. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Genes Genet Syst.* 81:51-56.
- Shiba Y, Yokoyama Y, Aono Y, Kiuchi T, Kusaka J, Matsumoto K and Hara H.** 2004. Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth

defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J Bacteriol.* 86:6526-6535.

Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Aoki S and Machida Y. 1993. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J Biol Chem.* 268:26552-26558.

Shipkowski S and Brenchley JE. 2006. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7730-7738.

Silhavy TJ and Hultgren SJ. 2005. Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187:7680-7686.

Slekar HK, Kosman DJ and Culotta VC. 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem.* 271:28831-28836.

Soncini FC and Groisman EA. 1996. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol.* 178:6796-6801.

Soto GE and Hultgren SJ. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.* 181:1059-71.

Spiro RG. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in Enzymology.* 8:3-27.

Stewart V. 2003. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem Soc Trans.* 31:1-10.

Stickland LH. 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J Gen Microbiol.* 5:698-703.

Stout V and Gottesman S. 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172:659-669.

Sugawara E and Nikaido H. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 267:2507-2511.

Takeda SI, Fujisawa Y, Matsubara M, Aiba H and Mizuno T. 2001. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC→YojN→RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol.* 40:440-450.

Talaga P, Coge V, Wieruszkeski JM, Stahl B, Lemoine J, Lippens G and Bohin JP. 2002. Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem.* 269:2464-2472.

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

Talaga P, Stahl B, Wieruszkeski JM, Hillenkamp F, Tsuyumu S, Lippens G and Bohin, JP. 1996. Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. *J Bacteriol.* 178:2263-2271.

- Tang DJ, He YQ, Feng JX, He BR, Jiang BL, Lu GT, Chen B and Tang JL.** 2005. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J. Bacteriol.* 187:6231-6237.
- Tchawa Yimga M, Leatham MP, Allen JH, Laux DC, Conway T and Cohen PS.** 2006. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 74:1130-1140.
- Thomson NR, Nasser W, McGowan S, Sebahia M and Salmond GP.** 1999. *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the IciR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology.* 145:1531-1545.
- Tobe T, Ando H, Ishikawa H, Abe H, Tashiro K, Hayashi T, Kuhara S and Sugimoto N.** 2005. Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signaling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol Microbiol.* 58:320-333.
- Tomenius H, Pernestig AK, Jonas K, Georgellis D, Möllby R, Normark S and Melefors O.** 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. *BMC Microbiol.* 106:27.
- Toth IK, Bell KS, Holeva MC and Birch PRJ.** 2003. Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology.* 4:17-30.
- Tsuyumu S.** 1979. Self-catabolite repression of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol.* 137:1035-1036.
- Van Golde LMG, Schulman H and Kennedy EP.** 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.
- Vanden Boom T and Cronan JE.** 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 43:317-343.
- Varela C, Agosin E, Baez M, Klapa M and Stephanopoulos G.** 2003. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:547-555.
- Venecia K and Young GM.** 2005. Environmental regulation and virulence attributes of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Infect Immun.* 73:5961-5977.
- Vieira J and Messing J.** 1982. The pUC plasmids and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 19:259-268.
- Vimr E, Steenbergen S and Cieslewicz M.** 1995. Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. *J Ind Microbiol.* 15:352-360.
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, and Visser RG.** 2003. If homogalacturonan were a side chain of hamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132:1781-1789.
- Von Ossowski I, Stahlberg J, Koivula A, Piens K, Becker D, Boer H, Harle R, Harris M, Divne C, Mahdi S, Zhao Y, Driguez H, Claeysens M, Sinnott ML and Teeri TT.** 2003.

- Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *J. Mol. Biol.* 333: 817-829.
- Wadhams GH and Armitage JP.** 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:1024-1037.
- Wehland M et Bernhard F.** 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem.* 275:7013-7020.
- Weissborn AC and Kennedy EP.** 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.* 259:12644-12651.
- Willats WG, McCartney L, Mackie W and Knox JP.** 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol.* 47:9-27.
- Williams CL, Boucher PE, Stibitz S and Cotter PA.** 2005. BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of *bipA* in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 56:175-188.
- Winfield MD, Latifi D and Groisman, EA.** 2005. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J Biol Chem.* 280:14765-14772.
- Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R and Ishihama A.** 2005. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 280:1448-1456.
- Yang CH, Gavilanes-Ruiz M, Okinaka Y, Vedel R, Berthuy I, Boccara M, Chen JW, Perna NT and Keen NT.** 2002. *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol Plant Microbe Intact.* 15:472-480.
- Yohannes E, Barnhart DM and Slonczewski JL.** 2004. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol.* 186:192-199.
- Yoo JS, Jung YJ, Chung SY, Lee YC and Choi YL.** 2004. Molecular cloning and characterization of CMCase gene (*celC*) from *Salmonella typhimurium* UR. *J Microbiol.* 42:205-210.
- York WS.** 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.
- Zhang YB and Broome-Smith JK.** 1990. Correct insertion of a simple eukaryotype plasma-membrane protein into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Gene.* 96:51-57.
- Zhu Y, Pettolino F, Mau SL and Bacic A.** 2005. Characterization of cell wall polysaccharides from medicinal plant *Panax notoginseng*. *Phytochemistry.* 66: 1067-1076.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Fiche technique du vecteur pET-29a (+)

Annexe 2: Fiche technique du vecteur pGEX-6P

pET-29a(+) Restriction Sites

TB076 12/98

Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations		
AccI	2	180 2996	BstXI	3	927 1056 1179	Pfi108I	1	2012		
AccII	7	892 1620 1951 2735 2876	BstYI	9	132 198 241 689 1901	PfIMI	3	260 707 4691		
		3178 4969			2418 3867 3878 4677	PleI	9	382 674 761 1557 3120		
Acil	75		Cac8I	40				3605 4660 5064 5072		
AflIII	2	1125 3226	CjeI	24		PshAI	1	1970		
AluI	22		CjePI	18		Psp5II	1	2232		
AlwI	13		ClaI	2	402 4119	Psp1406I	4	787 2155 2551 4914		
Alw2II	7	159 190 625 1109 2220	CviJI	84		PvuI	1	4428		
		3044 3544	CviRI	22		PvuII	3	1725 1818 2817		
Alw44I	3	1105 3040 3540	DdeI	11		RcaI	3	523 3946 4821		
AlwNI	1	3642	DpnI	23		RsaI	4	236 1272 3032 4263		
ApaI	1	1336	DrallI	1	5129	SacI	1	190		
ApaBI	1	809	DrdI	3	2919 3334 5084	Sall	1	179		
ApoI	7	192 270 1400 4041 4225	DrdII	2	848 5134	SapI	1	3110		
		4931 4942	DsaI	3	212 562 2198	Sau96I	14			
AvaI	2	158 4300	EaeI	4	166 433 565 1799	Sau3AI	23			
Avall	5	1677 2053 2141 2232 2511	EagI	1	166	ScrFI	22			
BaeI	1	233	EarI	3	743 3110 4241	SfaNI	23			
BamHI	1	198	EcI	3	902 3300 3446	SfiI	4	367 3491 3682 5348		
BanI	10	226 234 447 468 582	Eco47III	3	530 2031 2480	SgfI	1	4428		
		1045 1764 1894 2020 5166	Eco57I	1	3774	SgrAI	1	444		
BanII	6	190 509 523 1336 4083	EcoNI	2	660 4340	SmaI	1	4302		
		5204	EcoO109I	3	53 558 2232	SphI	1	600		
BbsI	4	1271 1610 1984 2344	EcoRI	1	192	SspI	2	4353 4921		
BbvI	25		EcoRII	10	229 848 1163 1703 1760	StyI	2	57 212		
BccI	13				3252 3373 3386 4316 4673	TaqI	17			
Bce83I	6	21 1939 2109 3317 3615	EcoRV	1	206	TaqII	6	1033 1251 1924 3128 4682		
		3856	FauI	17				5033		
BceII	6	644 985 1612 3728 4747	FokI	9	1171 1180 2445 2507 2585	TfiI	9	1804 2106 2276 2780 3201		
		5155			2771 2912 4066 4672			4339 4395 4567 4658		
BcgI	8	160 194 1417 1451 1951	FspI	1	2207	ThaI	36			
		1985 2803 2837	GdiI	4	166 433 565 1799	TseI	25			
BclI	1	1139	HaeI	6	853 2174 3241 3252 3704	Tsp45I	7	1306 2134 2665 2878 2973		
Bfal	1	2189			4515			4575 5302		
BgIII	1	241	HaeII	14		Tsp509I	21			
BmgI	1	1334	HaeIII	23		Tth1111I	1	2971		
Bpml	4	963 1452 2086 2753	HgaI	11		Tth1111II	8	964 1657 2687 3816 3823		
Bpu10I	2	2332 4445	HgiEII	2	723 3812			3855 4264 4391		
Bpu1102I	1	80	HhaI	46		UbaJI	18			
BsaAI	2	2978 5129	Hin4I	4	203 1024 4114 4656	VspI	5	382 1810 1869 4627 4816		
BsaBI	3	398 408 2423	HincII	2	181 1631	XbaI	1	333		
BsaHI	5	448 469 583 1082 1765	HindIII	1	173	XcmI	3	981 1497 1515		
BsaJI	11		HinFI	18		XhoI	1	158		
BsaWI	7	2 1444 1947 2415 3432	HpaI	1	1631	XmnI	2	2784 4817		
		3579 4563	HphI	16						
BsaXI	2	1784 5077	KpnI	1	238					
Bsbl	2	2942 5036	MaellI	14		Enzymes that do not cut pET-29a(+):				
BscGI	11		MaellII	16		AatII	AflIII	AgeI	AscI	AvrII
BsgI	3	976 1176 2386	MbolI	12		BsaI	BseRI	BspMI	BsrGI	Bsu36I
Bsil	1	3399	MluI	1	1125	Dral	Eam1105I	FseI	MscI	MunI
BsiEI	5	169 1910 3142 3566 4428	MmeI	7	3441 3625 4070 4264 4626	NheI	PacI	PmeI	PmlI	PstI
BsII	26				4635 5106	RleAI	RsrII	SacII	Scal	SexAI
BsmI	2	4312 4389	MnlI	25		SfiI	SnaBI	SpeI	SrfI	Sse8387I
BsmAI	6	822 1227 1353 1740 2867	MseI	25		StuI	SunI	Swal		
		4444	MslI	6	1177 1465 1495 2213 2408					
BsmBI	3	1740 2867 4444			2799					
BsmFI	4	586 2127 2497 5344	MspI	29						
BsoFI	43		MspAII	9	84 283 1155 1725 1818					
Bsp24I	10	415 447 966 998 1268			2817 2936 3568 3813					
		1300 3719 3751 3897 3929	MwoI	39						
Bsp1286I	12		NarI	4	448 469 583 1765					
BspEI	2	2 2415	NciI	12						
BspGI	1	2752	NcoI	1	212					
BspLU11I	1	3226	NdeI	1	295					
Bsrl	21		NgoAIV	4	435 2023 2183 5230					
BsrBI	4	354 3159 4827 5273	NlaIII	26						
BsrDI	2	1172 1538	NlaIV	24						
BsrFI	7	435 444 811 2023 2183	NotI	1	166					
		4382 5230	NruI	1	4085					
BssHII	1	1536	NsiI	2	4278 4544					
Bst1107I	1	2997	NspI	4	600 2571 2863 3230					
BstEII	1	1306	NspV	1	268					

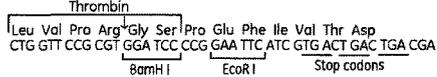
pGEX Vectors, GST Gene Fusion System

Map of the glutathione S-transferase fusion vectors showing the reading frames and main features. Even though stop codons in all three frames are not depicted in this map, all thirteen vectors have stop codons in all three frames downstream from the multiple cloning site.

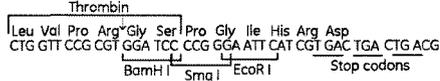
Do you want to learn more? Read the GST Gene Fusion System Handbook (18-1142-75). Please contact your local GE Healthcare representative for a printed copy.

www.gelifesciences.com/pgex

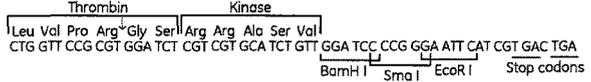
pGEX-1λT (27-4805-01)



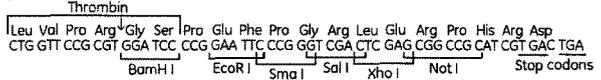
pGEX-2T (27-4801-01)



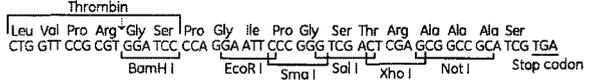
pGEX-2TK (27-4587-01)



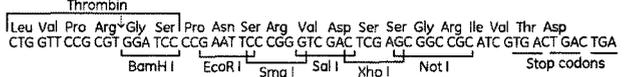
pGEX-4T-1 (27-4580-01)



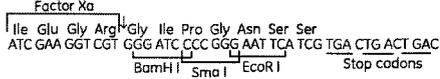
pGEX-4T-2 (27-4581-01)



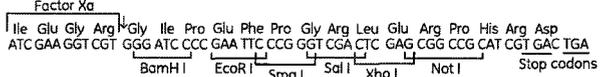
pGEX-4T-3 (27-4583-01)



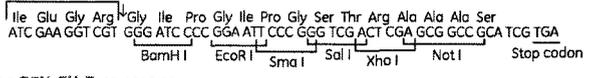
pGEX-3X (27-4803-01)



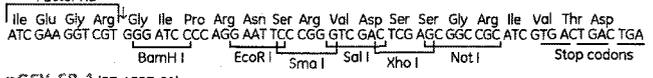
pGEX-5X-1 (27-4584-01)



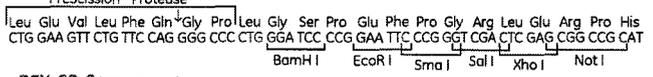
pGEX-5X-2 (27-4585-01)



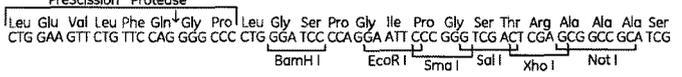
pGEX-5X-3 (27-4586-01)



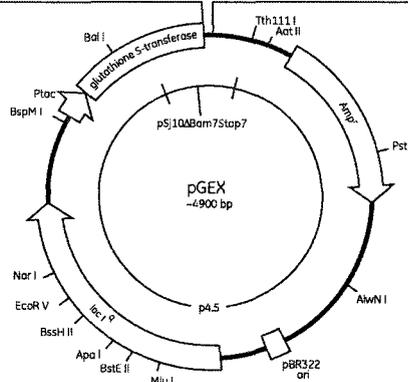
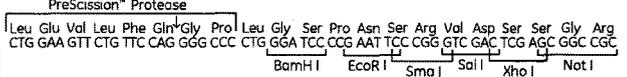
pGEX-6P-1 (27-4597-01)



pGEX-6P-2 (27-4598-01)



pGEX-6P-3 (27-4599-01)



Publications

Publications

Article 1 : **Bouchart F***, **Delangle A***, **Lemoine J**, **Bohin JP** and **Lacroix JM**. 2007. Proteomic analysis of a non virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology*. 153: 760-767.

Article 2 : **Delangle A**, **Prouvost AF**, **Cogez V**, **Bohin JP**, **Lacroix JM** and **Hugouvieux-Cotte-Pattat N**. Accepted in july 2007. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi gan* locus involved in galactan catabolism. *J Bacteriol*.

Article 3 : **Lequette Y**, **Rollet E**, **Delangle A**, **Peter Greenberg** and **Bohin JP**. Accepted in june 2007. Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*.

Proteomic analysis of a non-virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism

Franck Bouchart,† Aurélie Delangle,† Jérôme Lemoine, Jean-Pierre Bohin and Jean-Marie Lacroix

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576 IFR 118, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Correspondence

Jean-Marie Lacroix

jean-marie.lacroix@univ-lille1.fr

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are general constituents of the envelope of Gram-negative bacteria. They are required for full virulence of bacterial phytopathogens such as *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* and *Erwinia chrysanthemi*. *E. chrysanthemi* is a pectinolytic γ -proteobacterium that causes soft rot disease on a wide range of plant species. In addition to the loss of virulence, *opg* mutants exhibit a pleiotropic phenotype that affects motility, bile-salt resistance, exoenzyme secretion, exopolysaccharide synthesis and membrane lipid composition. This is believed to be the first proteomic analysis of an OPG-defective mutant of *E. chrysanthemi* and it revealed that, in addition to the effects described, catabolic enzyme synthesis was enhanced and there was a greater abundance of some proteins catalysing the folding and degradation of proteins needed for various stress responses. Thus, in the *opg* mutant strain, loss of virulence was the result of a combination of envelope structure changes and cellular metabolism modifications.

Received 21 July 2006

Revised 23 October 2006

Accepted 2 November 2006

INTRODUCTION

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are general periplasmic constituents of the envelope of many Gram-negative bacteria. Their common features are that (i) glucose is the sole constitutive sugar, and (ii) their abundance in the periplasm increases as the osmolarity of the medium decreases (Bohin & Lacroix, 2006). OPG synthesis mutants of phytopathogenic bacteria fail to incite disease in their plant hosts (Bohin & Lacroix, 2006). Mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* devoid of OPGs show a reduced virulence on the common bean and its plant host, and fail to elicit a hypersensitive response on tobacco, a non-host plant (Bohin & Lacroix, 2006; Loubens *et al.*, 1993). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* deficient in OPG biosynthesis shows an attenuated virulence in tomato (Minsavage *et al.*, 2004). *Erwinia chrysanthemi* *opg* mutants are completely non-virulent when inoculated into potato tubers or chicory leaves (Page *et al.*, 2001). In *E. chrysanthemi*, synthesis of the glucose backbone of OPGs is catalysed by both of the products of the *opgGH* operon: OpgG and OpgH catalyse

the synthesis of linear glucans containing 5–13 glucose units joined by $\beta(1\rightarrow2)$ linkages and branched by $\beta(1\rightarrow6)$ linkages (Cogez *et al.*, 2001). Mutations in *opgG* or *opgH* completely abolish OPG synthesis (Page *et al.*, 2001).

E. chrysanthemi causes soft rot disease in a wide range of plant species, including crops of economic importance, such as vegetables and ornamentals. The virulence of *E. chrysanthemi* is strongly associated with the synthesis and secretion of exoenzymes, particularly pectinases and, to a lesser extent, cellulases and proteases. Pectinases and cellulases are secreted through a type II secretory apparatus known as Out, while proteases are secreted by a type I secretory system. Action of these enzymes causes maceration of the plant tissues, leads to the extension of the disease throughout the plant and provides bacteria with carbon sources (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). In addition to the non-virulent phenotype, *opgG* or *opgH* mutants exhibit a pleiotropic phenotype: colonies are mucoid (exopolysaccharide overproduction), and motility, bile-salt resistance and secretion of exoenzymes are reduced (Page *et al.*, 2001). The Opg⁻ phenotypes observed may be explained by a modification in envelope composition. One could hypothesize that the absence of virulence for *opgG* mutants is a consequence of the reduction of the secretion

†These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: OPG, osmoregulated periplasmic glucans; TCA, tricarboxylic acid.

of exoenzymes. An *outC* mutant, defective in the Out type II secretory system, is more severely affected in pectinase secretion than an *opgG* mutant. When inoculated into potato tubers or chicory leaves, the virulence of the *outC* mutant is severely reduced, but not abolished. Co-inoculation experiments with a mix of a mutant strain and the wild-type strain were performed in potato tubers. *outC* mutant cells grew normally in the mix, while no growth was observed for the *opgG* mutant cells contained in the mix. Thus, loss of virulence of *opgG* mutants does not result simply from a deficiency in exoenzyme secretion (Page *et al.*, 2001). In addition, some of the OPGs are released into the medium by wild-type cells, indicating that OPGs play a role only within the periplasmic space of *E. chrysanthemi* (Cogez *et al.*, 2001). It has often been reported that lack of an envelope component affects the surface properties of bacteria, and thus the interaction of bacteria with their environment.

In this paper, a comparative analysis of the soluble proteome of wild-type cells and *opgG* mutant cells of *E. chrysanthemi* was performed. Synthesis of several proteins governing essential cellular processes, such as protein folding and degradation, and carbohydrate catabolism, was increased. This suggests that the non-virulent phenotype of the *opgG* mutant is a complex phenomenon that includes, but is not restricted to, changes in the surface properties of the envelope.

METHODS

Bacterial strains and media. Wild-type *E. chrysanthemi* (EC3937) and its *opgG::uidA-Kan* (NFB3500) (Page *et al.*, 2001) derivative

strain, were grown at 30 °C, with vigorous shaking, in Luria–Bertani broth (LB) medium that contained 10g bactotryptone l⁻¹ and 5g yeast extract l⁻¹ (Difco), but did not contain NaCl (low-osmolarity medium, 90 mosmol l⁻¹).

Extraction of proteins. Bacteria were grown to mid-exponential phase, harvested by centrifugation and washed with 0.1 M phosphate buffer, pH 6.6, containing 20 mM MgSO₄ and a protease inhibitor cocktail (Complete; Roche). The cell pellets were resuspended in the same buffer. Cells were disrupted by passing through a precooled French pressure cell at 1.4 × 10⁷ Pa. The lysates were centrifuged at 16 000 g at 4 °C for 30 min to separate supernatants and pellets. The supernatants were treated by a mix of DNase I (10 µg ml⁻¹) and RNase A (10 µg ml⁻¹) at 4 °C for 30 min and then centrifuged at 45 000 g at 4 °C for 30 min. Four volumes of acetone were added to the supernatants and they were incubated at -20 °C for 1 h before centrifugation at 13 000 g for 15 min. The pellets were washed with 75 % ethanol, dried and resuspended in solubilization buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4 % (w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich), 65 mM DTT (Proteomic Solutions), 0.25 mM Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail]. Protein concentration was determined by the Bradford test using BSA (Protein assay standard II; Bio-Rad) as a standard (Bradford, 1976). Total protein concentration was determined according to Stickland (1951).

Electrophoresis of proteins. IEF was performed using 18 cm IPG strips (Immobiline DryStrip; GE Healthcare), with a linear gradient of pH ranging from 3 to 10. Protein solutions (600 µg in 200 µl of solubilization buffer) were mixed with 200 µl rehydration buffer [8 M urea, 2 M thiourea, 2 % (w/v) CHAPS, 100 mM DTT, 2 % (v/v) ampholytes (pH 3–10; Proteomic Solutions) and 0.001 % bromophenol blue]. After 16 h rehydration, IEF was performed using a pHaser isoelectric focusing system (Proteomic Solutions) at 20 °C for 10 000 Volt hours (V h), from 0 to 5000 V over 24 h. Before the second dimension, strips were immersed for 20 min in equilibration buffer [6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0.375 M Tris/HCl (pH 8.8) and 2 % DTT]. SDS-PAGE was carried out on a 12 % w/v polyacrylamide resolving gel (Duracryl 30 %; Proteomic

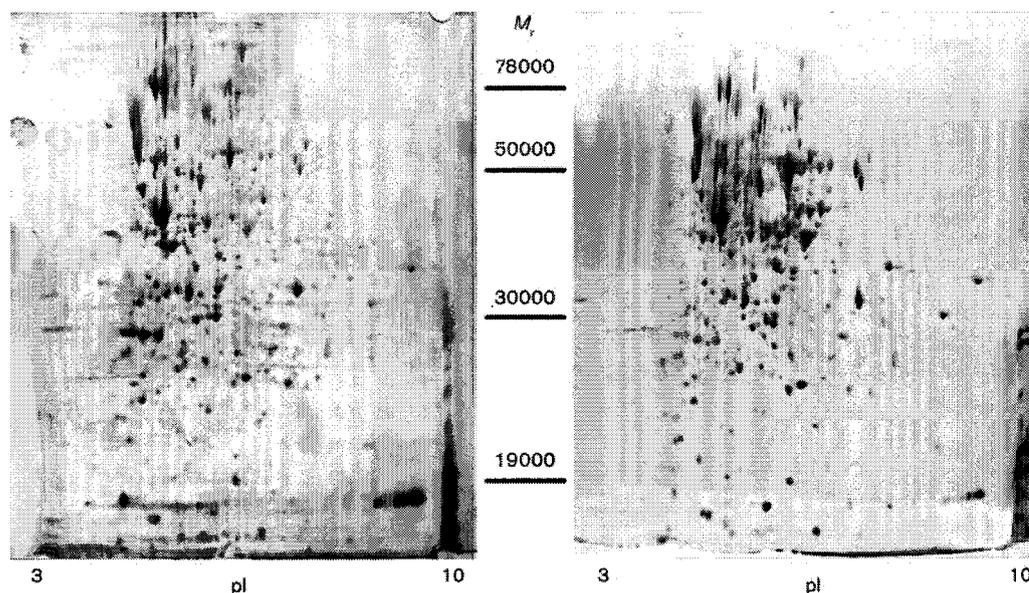


Fig. 1. Silver-stained 2D gels of the soluble proteome from exponential-phase bacteria grown in LB medium without NaCl. Left, *E. chrysanthemi* EC3937; right, the *opgG*-derivative strain NFB3500.

Solutions) in running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). Proteins were visualized by staining gels with silver nitrate solution, according to Rabilloud (1999).

Analysis of 2D electrophoresis gels. Image analysis of 2D electrophoresis gels was performed using the Melanie Image Master 2D Platinum 5 software (GE Healthcare) and three gels from each condition. The proteome profile of wild-type *E. chrysanthemi* EC3937 was used as a reference pattern for spot analysis and all spot files were matched to the reference pattern. The intensity of each spot was normalized by total spot intensity.

Protein identification by MALDI-TOF MS. Spots were excised from gel and washed three times with 50 μ l 25 mM ammonium bicarbonate and once with 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate. The supernatants were discarded and the gel pieces were dried. The proteins were digested in-gel with 20 ng porcine trypsin μ l⁻¹ (Promega) in 25 mM ammonium bicarbonate. The digestion was performed overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted from the gel by 1% formic acid and then by 50% acetonitrile in 1% formic acid. Supernatants from both the mutant and the wild-type were pooled and peptides were dried and

resuspended in 0.5% formic acid. A 0.5 μ l volume of the peptide solution was directly mixed with 1 μ l 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix [10 mg ml⁻¹ in methanol/water (7:3, v/v)] on the stainless steel target and allowed to crystallize in a gentle stream of air. Peptide mass fingerprint spectra were manually acquired on a MALDI-TOF MS instrument (DE STR Pro; Applied Biosystems). An in-house MASCOT (Matrix Sciences; <http://www.matrixscience.com/>) search engine was used for protein identification against the *E. chrysanthemi* database (<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm>).

RESULTS AND DISCUSSION

Growth of the *E. chrysanthemi* *opgG* mutant

Bacterial cells were grown in LB medium without NaCl, and growth was found to be similar for wild-type cells (EC3937) and *opgG* mutant cells (NFB3500). Total protein concentration was measured using a 50 ml culture sample taken at mid-exponential phase (OD₆₂₀ 0.4), and only a slight difference, if any, was observed between the two strains: 0.12

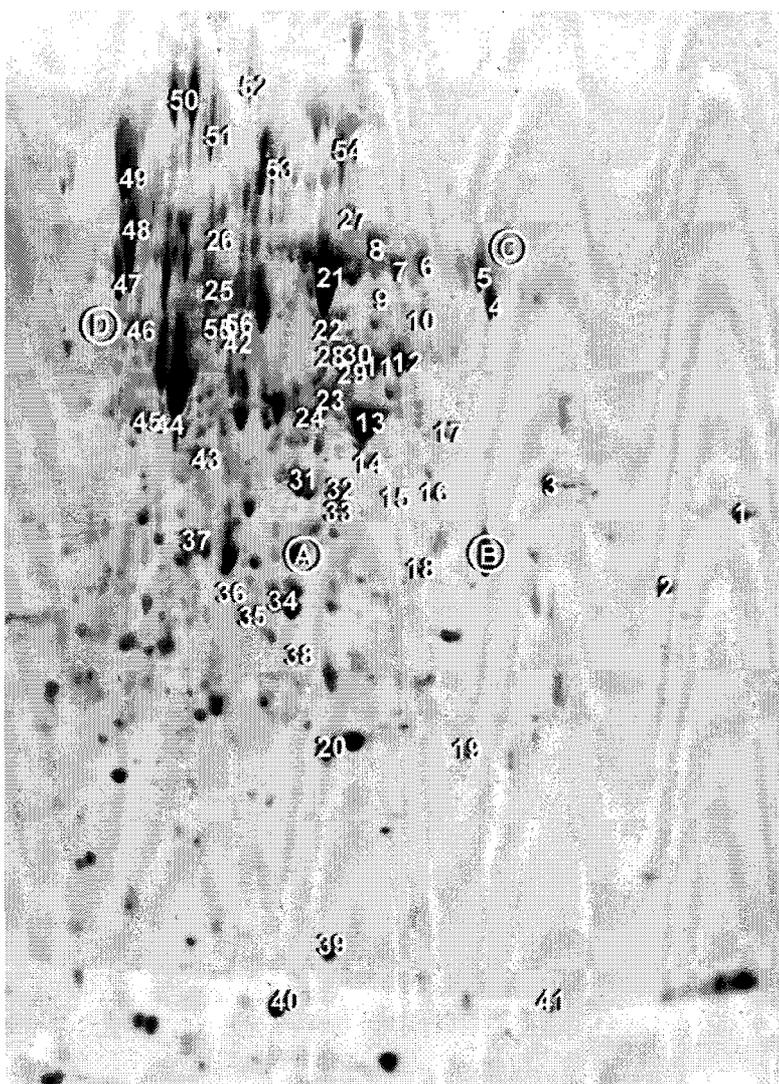


Fig. 2. Enlargement of the silver-stained 2D gel of the soluble proteome of the *E. chrysanthemi* *opgG*-derivative NFB3500. The numbers indicate spots that were identified. Spots A, B, C and D are landmarks for Melanie Image Master 2D Platinum 5 software calibration.

Table 1. Identification of proteins differentially expressed in the *opgG* mutant cells of *E. chrysanthemi*

Spot no.* and function	Accession no.†	pI	Mass (kDa)†	Gene†	Location	Ratio‡	Putative function†	Coverage	Score§	No. of peptides matched
Polysaccharide synthesis										
25	15220	5.4	51.2	<i>cpsG</i>	Cytoplasm	2.3	Phosphomannomutase	22	67	10
18	15224	6.2	35	<i>fcl</i>	Cytoplasm	1.6	GDP-L-fucose synthetase	27	52	7
33	20562	5.9	36.9	<i>galE</i>	Cytoplasm	2.8	UDP-glucose 4-epimerase	25	68	7
32	19489	5.8	32.3	<i>galF</i>	Cytoplasm	3	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase	39	89	10
37	20647	5.2	33.4	<i>galU</i>	Cytoplasm	8.3	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	30	56	8
24	20463	5.7	39.8	<i>rffG</i>	Cytoplasm	5.1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	31	86	9
23/28	19487	5.8	43.4	<i>ugd</i>	Cytoplasm	5	UDP-glucose dehydrogenase	21/54	65/282	6/22
Regulation										
51	16313	5.2	67.5	<i>bipA</i>	Cytoplasm	1.5	Ribosome-binding GTPase	29	77	16
Detoxification										
20	17551	5.8	22.4	No name	Cytoplasm	1.9	Alkyl hydroperoxide reductase	32	63	7
Amino acid metabolism										
11	18183	6.1	45.3	<i>glyA</i>	Cytoplasm	4.5	Serine hydroxymethyl transferase	29	66	14
Lipid metabolism										
4	17046	6.7	49.3	<i>accC</i>	Cytoplasm	2.2	Biotin carboxylase	27	51	14
39	19707	5.9	19.1	<i>fabA</i>	Cytoplasm	0.58	β -Hydroxydecanoyl thioester dehydratase	27	69	5
35	19259	5.4	28.2	<i>fabI</i>	Cytoplasm	0.47	Enoyl-ACP reductase	27	85	7
Nucleotide metabolism										
22	15203	5.8	47.3	<i>purA</i>	Cytoplasm	4.4	Adenylosuccinate synthase	18	75	11
30	17763	5.9	51.5	<i>purB</i>	Cytoplasm	8.3	Adenylosuccinate lyase	38	173	19
Carbohydrate metabolism										
52	19243	5.5	99.2	<i>aceE</i>	Cytoplasm	1.1	Subunit of pyruvate dehydrogenase	26	124	20
31	15181	5.6	39.1	<i>fabA</i>	Cytoplasm	4.7	Fructose-bisphosphate aldolase class II	20	50	7
13	18196	6.6	44.4	<i>ganA</i>	Periplasm	4.4	Endogalactanase	34	95	15
5	15062	6.5	56.7	<i>glpD</i>	Cytoplasm	5	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	38	174	25
21	20398	5.8	56	<i>glpK</i>	Cytoplasm	3.3	Glycerol kinase	29	223	17
14	15029	6.1	40.8	<i>glpQ</i>	Cytoplasm	2.8	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	50	96	18
12	16958	6.2	48.1	<i>gltA</i>	Cytoplasm	2.6	Citrate synthase	18	67	9
55	46981	5.3	51.5	<i>gnd</i>	Cytoplasm	1.9	6-Phosphogluconate dehydrogenase	23	55	10
38	20551	5.7	28.6	<i>gpmA</i>	Cytoplasm	2.9	Phosphoglyceromutase 1	22	53	6
27	17827	5.9	61.2	<i>pgi</i>	Cytoplasm	5.6	Phosphoglucose isomerase	30	61	13
50	19893	5.1	87.2	<i>ppsA</i>	Cytoplasm	0.59	Phosphoenolpyruvate synthase	22	86	15
53	16955	5.7	64.5	<i>sdhA</i>	Cytoplasm	3.9	Succinate dehydrogenase	26	114	17
26	20198	5.3	62.9	<i>sfcA</i>	Cytoplasm	0.42	Malate dehydrogenase (gluconeogenesis)	26	101	13
54	15185	5.9	71.9	<i>tktA</i>	Cytoplasm	4.2	Transketolase 1 isoenzyme	21	107	14
43	20276	5.3	40	<i>yiaY</i>	Cytoplasm	0.3	Alcohol dehydrogenase	54	66	19

Table 1. cont.

Spot no.* and function	Accession no.†	pI	Mass (kDa)†	Gene†	Location	Ratio‡	Putative function†	Coverage	Score§	No. of peptides matched
Protein folding and degradation										
42	19559	5.4	46.7	<i>clpX</i>	Cytoplasm	3	Subunit of ClpXP protease	32	116	12
10	15693	7.7	47.9	<i>degQ</i>	Periplasm	2.7	Serine endoprotease	34	181	15
36/56	15461	6.1	29.9	<i>fkpA</i>	Periplasm		FKPB chaperone	37/39	67/93	12/13
48	18669	4.9	57.5	<i>groL</i>	Cytoplasm	1.2	GroEL subunit of GroES/GroEL chaperone	57	118	40
40	18667	5.7	10.5	<i>groS</i>	Cytoplasm	2.7	GroES subunit of GroES/GroEL chaperone	55	71	5
6	16590	6.4	54.8	<i>pepA</i>	Cytoplasm	4.9	Aminopeptidase	17	55	9
29	20133	5.9	46.9	<i>pepB</i>	Cytoplasm	8.4	Aminopeptidase	37	154	18
9	17747	6.1	50.4	<i>pepQ</i>	Cytoplasm	0.77	Proline dipeptidase	18	53	7
47	20523	4.9	48.2	<i>tig</i>	Cytoplasm	3.4	Trigger factor	62	74	34
Transport										
46	14785	5	50.3	<i>atpD</i>	Cytoplasm	0.7	ATP synthase β subunit	37	76	11
2	18320	8.6	34.1	<i>glfI</i>	Periplasm	1.8	Glutamate-binding protein	61	149	21
34	18377	6.5	35.8	<i>mglB</i>	Periplasm	2.4	Galactose-binding protein	56	134	16
8	20639	6.4	61.3	<i>oppA</i>	Periplasm	3	Oligopeptide-binding protein	38	105	22
16	19819	7.6	41	<i>potF</i>	Periplasm	1.5	Putrescine-binding protein	22	59	8
3	20233	8.8	36.8	Unknown	Periplasm	2.9	Iron-binding protein	30	61	11
Transcription										
44/45	16922	5	36.6	<i>rpoA</i>	Cytoplasm	2	RNA polymerase α subunit	38/40	75/59	11/17
Translation										
49	46566	4.9	61.3	<i>rpsA</i>	Cytoplasm	1.6	S1 protein of 30S ribosomal subunit	55	210	29
15	20829	6.1	37.7	<i>trpS</i>	Cytoplasm	2.5	Tryptophanyl-tRNA synthetase	21	102	10
Unknown function										
17	15570	7.8	45.5	<i>ydjI</i>	Unknown	3.5	Unknown	25	108	10
41	15573	8.5	17.1	Unknown	Unknown	9.1	Unknown	48	103	8
7	47171	6.3	50.7	Unknown	Unknown	2.9	Unknown	18	65	10
19	47181	6.6	25.6	Unknown	Unknown	0.42	Unknown	42	69	9

*Spot numbers refer to the proteins labelled in Fig. 2.

†As given in the *E. chrysanthemi* database (<http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm>).

‡Spot intensity for each protein derived from the *opgG* mutant cells with respect to the protein derived from the wild-type cells.

§Score is $(-10)\log P$; P is the probability that the observed match is a random event.

||FkpA was detected in the *opgG* mutant strain NFB3500 only.

and 0.11 mg ml⁻¹ for the wild-type and the mutant, respectively.

Identification of proteins with an altered pattern of synthesis

The properties of several Opg⁻ phenotypes suggested that envelope perturbation had occurred. To quantify the amount of envelope perturbation, 1D SDS-PAGE of membrane proteins was performed. No significant difference was observed between the protein patterns for the *opgG* mutant and the wild-type, indicating that the synthesis of major membrane proteins was only slightly affected in the *opgG* mutant strain (data not shown). Thus, to get better insight into the Opg⁻ phenotype, a 2D comparative analysis of the soluble proteome of the two strains was performed.

The soluble proteins of *E. chrysanthemi* extracted from the wild-type strain EC3937, and from the *opgG* strain NFB3500, were separated on high-resolution 2D electrophoresis gels (pH 3–10) (Figs 1 and 2). Most of the spots observed were located in a pI range of 4.6–6.6. Three analytical gels for each condition were analysed and compared by the Melanie 5 software, which generates standardized synthetic images. The two resulting synthetic gels allowed detection of 275 and 218 spots for the wild-type and the *opgG* mutant, respectively. Spots of 55 polypeptides, showing differences in intensity between the wild-type and the mutant, were excised from the gels, submitted to trypsin digestion and analysed by MALDI-TOF MS. The experimental mass fingerprint was compared with the genomic database of *E. chrysanthemi* using Mascot software. For each polypeptide, the mass and pI obtained from the 2D analytical gels were in agreement with the theoretical mass and pI of the deduced protein. Functions were assigned to 51 of the 55 spots (Table 1). As expected, most of the proteins (42) originated from the cytoplasm, while 9 originated from the periplasm. The proteins were assigned into 11 classes of cellular function, with almost half (25) being assigned to protein folding and degradation and carbohydrate metabolism. We focused on proteins showing a differential expression level of around 2 or more and, among these, only three were expressed to a lesser extent in the mutant strain NFB3500.

Envelope composition is modified in *opgG* cells

In *E. chrysanthemi*, as in other Gram-negative bacteria, one of the phenotypes encountered in *opg* mutants is overproduction of the exopolysaccharides known to protect cells from environmental injury (Bohin, 2000). We report here the overexpression of five genes needed for exopolysaccharide biosynthesis. *cpsG* encodes a phosphomannomutase (Stevenson *et al.*, 1996). *galE*, *galU* and *galF* encode proteins that catalyse steps in LPS core biosynthesis. GalE is the UDP-glucose 4-epimerase, and GalU and GalF are the two subunits of the UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase catalysing the reversible reaction of UTP and glucose 1-phosphate into UDP-glucose. Finally, *ugd* encodes

UDP-glucose dehydratase and, in addition, it participates in a modification of the core of LPS, which confers resistance toward antimicrobial peptides in *Salmonella enterica* and *Yersinia pestis* (Moulim & Groisman, 2003; Winfield *et al.*, 2005). Furthermore, RffG production was increased; this protein is a dTDP-glucose 4,6-dehydratase needed for the synthesis of both O antigen and enterobacterial common antigen (Keseler *et al.*, 2005). An increase in LPS biosynthesis has already been shown in a comparative quantification of monosaccharide production between the *opgG* and wild-type *E. chrysanthemi* strains. The analysis revealed a 1.5-fold increase in the level of Kdo, which is the specific monosaccharide of the core of the LPS, and in the level of *N*-acetylglucosamine, which is part of the lipid A moiety of LPS, in the *opgG* mutant strain, while the peptidoglycan level remained stable (Bohin *et al.*, 2005).

Lipid metabolism was enhanced and fatty acid saturation was decreased in *opgG* cells. Synthesis of a subunit of the acetyl CoA carboxylase (AccC protein), which participates in the first step of fatty acid synthesis, was increased, while synthesis of the enoyl-ACP reductase (FabI protein), which is implicated in the biosynthesis of unsaturated fatty acids, was reduced. Biochemical identification and quantification of the fatty acid composition of the wild-type and the *opgG* mutant of *E. chrysanthemi* EC3937 revealed a 20–30% reduction in the amount of C_{16:1} and C_{18:1} unsaturated fatty acids in the membrane phospholipids of the *opgG* mutant cells (Bohin *et al.*, 2005). Furthermore, expression of enzymes controlling glycerol catabolism (GlpD, GlpQ and GlpK) was increased. These findings suggest a rearrangement of the envelope structure in the *opgG* mutant cells.

Catabolic enzyme synthesis is enhanced in *opgG* cells

In this work, transport systems were detected by their soluble periplasmic-binding-protein component (Table 1), since all of these components belong to the ABC transporter family of proteins. Increased synthesis of two proteins, which are components of the nutrient uptake system, was detected: MglB, a galactose-binding protein; and OppA, the oligopeptide-binding protein serving for nutrition by peptides and recycling of muropeptides (Monnet, 2003). In addition, synthesis of a periplasmic endogalactanase (GanA) was increased. The gene encoding endogalactanase belongs to an operon controlling galactan uptake (A. Delangle, A.-F. Prouvost, V. Coge, J.-P. Bohin, J.-M. Lacroix & N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, unpublished results). Nutrient uptake appeared to be stimulated in the *opgG* mutant.

Enzymes related to carbohydrate metabolism were detected. All of the metabolic pathways discussed are according to Keseler *et al.* (2005). A gene from one of the pathways, *sfcA*, encoding the malic enzyme, was expressed to a lesser extent in the mutant. This enzyme catalyses the transformation of malate to pyruvate in one of the two possible gluconeogenesis pathways. Three overexpressed

genes encoded enzymes that are part of the glycolytic pathway. Phosphoglucose isomerase (Pgi) catalyses the first step of glucose degradation. The major fructose-bisphosphate aldolase (FbaA) displays 95% of its activity in glycolysis and is not required for gluconeogenesis in *Escherichia coli*. Synthesis of the phosphoglycerate mutase (encoded by *gpmA*) is increased in other bacterial species under various environmental stress conditions (Sanchez *et al.*, 2005). In addition, synthesis of the three enzymes of glycerol catabolism (GlpD, GlpQ and GlpK), which catalyse conversion of glycerol into dihydroxyacetone phosphate, was increased. The *galE*, *galU* and *galF* genes, whose products are needed for polysaccharide synthesis and also for galactose degradation, were overexpressed. Furthermore, increased levels of two proteins catalysing steps in the pentose phosphate pathway were observed: 6-phosphogluconate dehydrogenase (encoded by *gnd*) and the major transketolase (encoded by *tktA*). In *E. coli*, transketolase is the key enzyme regulating the flux between the pentose phosphate pathway and glycolysis. Transketolase is essential for pentose catabolism (Romeo & Snoep, 2005); increased synthesis leads to an increase in glyceraldehyde 3-phosphate and fructose 6-phosphate, thus supplying glycolysis with intermediates at two different levels. In addition, transketolase plays a protective role during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* (Slekar *et al.*, 1996) and its synthesis is increased in conditions of bile-salt stress in *Bifidobacterium longum* (Sanchez *et al.*, 2005). Two genes encoding enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle were overexpressed: *glcA* and *sdhA*, encoding citrate synthase and succinate dehydrogenase respectively. Increased synthesis of the latter enzyme suggested that the TCA cycle was closed, and functioned for both precursor and energy synthesis. In *E. coli* under aerobic conditions, the TCA cycle was not closed, stop before succinate, and was almost exclusively dedicated to precursor synthesis (Romeo & Snoep, 2005). Data indicate that in *E. coli*, an increase in energy requirement due to temperature-induced production of recombinant proteins is associated with succinate dehydrogenase overexpression and an increase in respiration (Hoffmann *et al.*, 2002). This suggests that energy metabolism is stimulated in response to OPG deficiency.

Protein folding and degradation are stimulated in *opgG* cells

It is well documented that the stress response includes increased synthesis of three classes of proteins: chaperones, proteases and peptidases. Synthesis of seven proteins governing protein folding or degradation was increased in the *opgG* mutant (Table 1). FkpA, a periplasmic chaperone with a *cis-trans* prolyl isomerase activity (Justice *et al.*, 2005), was detected in the proteome of the *opgG* mutant strain only. In *E. coli*, the *fkpA* gene is activated by an increase in unfolded envelope proteins caused by stress conditions affecting envelope integrity (Dartigalongue *et al.*, 2001). FkpA has been implicated in the heat-shock response and intracellular survival of *S. enterica* sv. Typhimurium (Horne *et al.*, 1997).

Intracellular survival depends on the Mip protein, which is an FkpA-like protein in *Legionella pneumophila* (Cianciotto *et al.*, 1990). Five other proteins were located in the cytoplasm. Tig is a chaperone with *cis-trans* prolyl isomerase activity that is bound to the ribosome and cooperates with the DnaK chaperone to promote folding of newly synthesized proteins (Deuerling *et al.*, 1999). For GroEL/GroES, another chaperone, synthesis of the regulatory component GroES was found to be significantly increased (Table 1). DegQ is a periplasmic serine endoprotease that degrades denatured or unfolded proteins that are produced in normal growth conditions, or are accumulated after various stress conditions (Yohannes *et al.*, 2004; Kolmar *et al.*, 1996). ClpX, the ATPase subunit of the ClpXP protease, was overexpressed, while ClpP, the catalytic subunit of this protease, was not detected. It is possible that we were not able to detect ClpP, or, alternatively, that only the *clpX* gene was overexpressed. The *pepA* and *pepB* genes, encoding two cytoplasmic peptidases, were overexpressed. In addition to its peptidase activity, PepA is involved in the regulation of virulence factors in *Vibrio cholerae* (Behari *et al.*, 2001). Furthermore, it has been reported that OppA and MglB, in addition to their role in substrate uptake, could play a role in protein folding. These chaperone-like proteins may participate in protection from stress in the periplasm (Richarme & Caldas, 1997). The results presented here suggest that *E. chrysanthemi opgG* strain responds to OPG deficiency by increasing the expression of several stress-response proteins.

Concluding remarks

The present work constitutes what we believe to be the first proteomic analysis of the production of soluble proteins in an *opg* mutant. Despite the global and non-exhaustive character of this analysis, it confirms the phenotypes previously described, and reveals several new phenotypes. *E. chrysanthemi* responds to OPG deficiency by activating cellular processes known to protect the cell against many environmental stresses, suggesting that the *opgG* strain is impaired in the perception of its environment. Our data demonstrate that the non-virulent character of *opgG* mutants does not result simply from modification in envelope composition leading to an impaired interaction between the surfaces of the bacteria and its host cell. Lack of infectivity is also a result of alterations in metabolism and fitness of *opgG* cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Anne-Sophie Vercoutter-Edouart for helpful discussion and expert technical advice. We thank Jean-Claude Michalski for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Behari, J., Stagon, L. & Calderwood, S. B. (2001). *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **183**, 178–188.

- Bohin, J.-P. (2000).** Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria – a minireview. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 11–19.
- Bohin, A., Bouchart, F., Richet, C., Kol, O., Leroy, Y., Timmerman, P., Huet, G., Bohin, J.-P. & Zanetta, J.-P. (2005).** GC/MS identification and quantification of constituents of bacterial lipids and glycoconjugates obtained after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives. *Anal Biochem* **340**, 231–244.
- Bohin, J.-P. & Lacroix, J.-M. (2006).** Osmoregulation in the periplasm. In *The Periplasm*, pp. 325–341. Edited by M. Ehrmann. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Cianciotto, N. P., Eisenstein, B. I., Mody, C. H. & Engelberg, N. C. (1990).** A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis* **162**, 121–126.
- Cogez, V., Talaga, P., Lemoine, J. & Bohin, J.-P. (2001).** Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **183**, 3127–3133.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S. (2001).** Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* **276**, 20866–20875.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. & Bukau, B. (1999).** Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**, 693–696.
- Hoffmann, F., Weber, J. & Rinas, U. (2002).** Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol Bioeng* **80**, 313–319.
- Horne, S. M., Kottom, T. J., Nolan, L. K. & Young, K. D. (1997).** Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella typhimurium* Copenhagen. *Infect Immun* **65**, 806–810.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. & Reverchon, S. (1996).** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 213–257.
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T. J. & Hultgren, S. J. (2005).** Periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 7680–7686.
- Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I. T., Peralta-Gil, M. & Karp, P. D. (2005).** EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33**, 334–337.
- Kolmar, H., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996).** The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* **178**, 5925–5929.
- 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**, 329–340.
- Minsavage, G. V., Mudgett, M. B., Stall, R. E. & Jones, J. B. (2004).** Importance of *opgHXcv* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host–parasite interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 152–161.
- Monnet, V. (2003).** Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2100–2114.
- Mouslim, C. & Groisman, E. A. (2003).** Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**, 335–344.
- 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**, 3134–3141.
- Rabilloud, T. (1999).** Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297–305.
- Richarme, G. & Caldas, D. T. (1997).** Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J Biol Chem* **272**, 15607–15612.
- Romeo, T. & Snoep, J. L. (2005).** Glycolysis and flux control. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Edited by F. C. Neidhardt, A. Bock, R. Curtiss, III, J. B. Kaper, T. Nyström, K. E. Rudd & C. L. Squires; <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Sanchez, B., Champomier-Vergès, M.-C., Anglade, P., Baraja, F., de los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A. & Zagorec, M. (2005).** Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol* **187**, 5799–5808.
- Slekar, K. H., Kosman, D. J. & Culotta, V. C. (1996).** The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem* **271**, 28831–28836.
- Stevenson, G., Adrianopoulos, K., Hobbs, M. & Reeves, P. R. (1996).** Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* **178**, 4885–4893.
- Stickland, L. H. (1951).** The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J Gen Microbiol* **5**, 698–703.
- Winfield, M. D., Latifi, T. & Groisman, E. A. (2005).** Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* **280**, 14765–14772.
- Yohannes, E., Barnhart, D. M. & Slonczewski, J. L. (2004).** pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **186**, 192–199.

Edited by: M. S. Ullrich

1 **Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* gan locus involved in galactan**
2 **catabolism**

3
4 Aurélie Delangle¹, Anne-France Prouvost¹, Virginie Cogez¹, Jean-Pierre Bohin¹,
5 Jean-Marie Lacroix^{1*} and Nicole Hugouvieux Cotte-Pattat²
6

7 Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR USTL-CNRS 8576 IFR147,
8 Université des Sciences et Technologies de Lille, bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex,
9 France¹. Microbiologie, Adaptation et Pathogénie UMR 5240 CNRS - Université Lyon 1 - INSA-
10 Lyon - BayerCropScience, Université de Lyon, domaine Scientifique de la Doua, Bâtiment André
11 Lwoff, 10 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex, France².

12
13 *Running title: gan locus of Erwinia chrysanthemi*

14 *corresponding author. Mailing address: Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
15 UMR USTL-CNRS 8576 IFR147, Université des Sciences et Technologies de Lille, bâtiment C9,
16 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Fax: 33 3 20 43 65 55. Phone: 33 3 20 43 65 92. E-
17 mail: jean-marie.lacroix@univ-lille1.fr.

18
19 **ABSTRACT**

20 β -1,4-galactan is a major component of the ramified regions of pectin. Analysis of the genome of
21 the plant pathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi* revealed the presence of a cluster of eight
22 genes encoding proteins potentially involved in galactan utilization. The predicted transport
23 system would comprise a specific porin GanL and an ABC transporter made of four proteins
24 GanFGK₂. Degradation of galactans would be catalyzed by the periplasmic 1,4- β -
25 endogalactanase GanA which released oligogalactans from trimer to hexamer. After their

1 transport through the inner membrane, oligogalactans would be degraded into galactose by the
2 cytoplasmic 1,4- β -exogalactanase GanB. Mutants affected for the porin or endogalactanase were
3 unable to grow on galactans but they grew on galactose and on a mixture of galactotriose,
4 galactotetraose, galactopentaose and galactohexaose. Mutants affected for the periplasmic
5 galactan binding protein, the transporter ATPase or the exogalactanase were only able to grow on
6 galactose. Thus, the phenotypes of these mutants confirmed the functionality of the *gan* locus in
7 transport and catabolism of galactans. These mutations did not affect the virulence of *E.*
8 *chrysanthemi* on chicory leaves, potato tubers or *Saintpaulia ionantha*, suggesting an accessory
9 role of galactan utilization in the bacterial pathogeny.

10

11

INTRODUCTION

12 Pectinolytic *Erwiniae* are enterobacteria that cause soft rot disease in a wide range of plant
13 species, including many crops of economic importance such as vegetables and ornamentals (34).

14 The maceration of plant tissues is essentially caused by the secretion by the bacteria of a set of
15 pectin-degrading enzymes (pectate-lyases, methylesterases, pectin-lyase, polygalacturonases...).

16 Pectin is the major matrix polysaccharide component of the primary cell wall and the middle
17 lamella in plants. The degradation of pectin results in the general disorganization of the plant cell
18 wall. *Erwinia chrysanthemi* is able to grow on the degraded polymers of pectin as the sole carbon
19 source (22). This degradation is regulated by a complex system of interconnected regulatory
20 networks (CRP, KdgR, PecT, PecS...) (22).

21 The pectic polysaccharides represent between 30 and 50% of the cell walls of dicotyledonous
22 plants. The pectic matrix is a complex mixture of homogalacturonan (HGA), rhamnogalacturonan
23 I (RGI) and rhamnogalacturonan II (RGII) polymers (37). HGA is a linear chain of α -1,4-
24 galacturonic acid (GalA). The RGII molecule has a HGA backbone with side chains containing a
25 diversity of sugars and linkages. RGI is a branched heteropolymer of alternating α -1,2-rhamnose

1 and α -1,4-GalA residues that carries neutral side chains of arabinan, galactan or arabinogalactan
2 attached to rhamnose residues of RGI backbone (44).

3 Two types of galactan side chains are distinguished. Type I consist of a chain of β -1,4- linked D-
4 galactopyranose backbone, while type II contains a backbone of β -1,3- linked D-galactopyranose
5 residues. The side chains significantly influence the physical properties of the pectin (26). In
6 potato and in notoginseng, β -1,4-galactan is the most abundant type of neutral side chain of RGI
7 and represents approximately 20% of the pectin oligosaccharides (46). Type I galactan is
8 degraded by 1,4- β -endogalactanases and 1,4- β -exogalactanases (12). Galactanases are widely
9 distributed into many plants. They cause the solubilization of pectin oligosaccharides and seem to
10 play a major role in ripening of fruits (30, 33). 1,4- β -endogalactanase has been also isolated from
11 microorganisms including aerobic fungi belonging to the genus *Aspergillus* (12) and bacteria
12 such as *Bacillus subtilis* (13) *Pseudomonas fluorescens* (8) and *Thermotoga maritima* (45).

13 *E. chrysanthemi* produces several enzymes allowing the catabolism of pectic polymers (20, 22).
14 Despite the fact that galactans may be an important carbon source derived from pectin, no
15 galactan degrading system has been described in *E. chrysanthemi*. Examination of the *E.*
16 *chrysanthemi* genome (16) revealed a locus potentially involved in galactan degradation and
17 catabolism. In this paper, we report experimental data demonstrating that the *gan* locus of *E.*
18 *chrysanthemi* encodes a whole functional system for galactan utilization. The *E. chrysanthemi*
19 galactan transport proteins shows similarities with *E. coli* maltose transport proteins (6). Galactan
20 catabolism is catalyzed by a 1,4- β -endogalactanase and a 1,4- β -exogalactanase. The regulation of
21 the corresponding genes was analyzed and the impact of galactan utilization on the virulence was
22 tested.

23 24 MATERIALS AND METHODS

25 **Bacterial strains, media and growth conditions.** *E. chrysanthemi* and *E. coli* strains are listed

1 in Table 1. Bacteria were grown at 30°C (*E. chrysanthemi*) or 37°C (*E. coli*) in Luria-Bertani
2 broth (LB) or in minimal medium M63 supplemented with a carbon source at a concentration of
3 2 g/l (31). Solid media were obtained by adding agar at 15 g/l. Pectic galactans from potato,
4 galactobiose and azurine-crosslinked galactan (AZCL-galactan) were purchased from Megazyme
5 (Bray, Ireland). Oligogalactans from Gal₃ to Gal₆ were obtained after a 6 h hydrolysis of pectic
6 galactans 1% by the *E. chrysanthemi* 1,4-β-endogalactanase GanA in a sodium acetate buffer 0.2
7 M. The hexose content of galactose, galactans and oligogalactans solutions was measured by the
8 anthrone method (43). AZCL-galactan was used in overlay at 2 g/l on solid minimal medium
9 M63 containing glycerol as a carbon source. The degradation of AZCL-galactan was observed by
10 a blue halo.

11 Comparison of growth on galactose (2 g/l), galactobiose (1 g/l) or oligogalactans (0.5 g/l) was
12 done in triplicate in 2.5 ml cultures after 18 h of incubation.

13 Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin and kanamycin at 50 µg/ml (*E.*
14 *coli*) or 25 µg/ml (*E. chrysanthemi*); chloramphenicol at 25 g/ml (*E. coli*) or 12.5 µg/ml (*E.*
15 *chrysanthemi*). X-Gal (5bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside) was used at a
16 concentration of 20 µg/ml.

17 **Recombinant DNA techniques.** Genomic and plasmid DNA extractions were performed
18 according to standard procedures (40). Restriction enzymes (Eurogentec) and T4 DNA ligase
19 (Gibco-BRL) were used according to the manufacturer's recommendations.

20 **Construction of the mutations.** Plasmids are listed in Table 2. PCR primers were designed to
21 amplify 1.1 to 2.1 kb of *E. chrysanthemi* 3937 chromosomal DNA encoding the *gan* genes (Table
22 3). Restriction sites were added in each primer to facilitate determination of the DNA orientation
23 in the vector (usually *Bam*HI or *Bgl*III at the 5' end and *Xba*I at the 3' end). The PCR products
24 were purified (QIAquick PCR purification kit, Qiagen), and ligated to the pGEM-T vector
25 (Promega) which has a protruding T nucleotide at each 3'-end. For *ganK*, the amplified fragment

1 was digested with *Xho*I and cloned into the same site of pBluescript II SK (+).

2 Inactivation and genetic fusions were constructed from the cloned genes, by insertion of *uidA*-
3 Kan cassette (3) into a restriction site situated inside the corresponding open reading frame. The
4 *uidA*-Kan cassette was inserted into the *Hpa*I site of *ganB*, the *Eco*RV site of *ganA*, the *Bgl*III site
5 of *ganE*, the *Bam*HI site of *ganL* and *Zra*I site of *ganK*. The orientation of the *uidA*-Kan cassette
6 was determined by restriction analysis. Only plasmids in which *uidA* and the mutated gene have
7 the same transcriptional direction were retained. Inactivation of *ganR* and *ganB* was performed
8 by inserting a *Cml*^R cassette (originating from pNFCml) into the *Pst*I site and *Nru*I site,
9 respectively. This *Cml*^R cassette is flanked by two FRT sites recognized by the FLP recombinase.
10 The FLP recombinase (expressed by the pCP20 plasmid) was used to obtain a *ganB* *Cml*^S mutant
11 by removing the *Cml*^R cassette (10).

12 **Transduction, conjugation and transformation.** Transformation of *E. coli* cells was carried out
13 by the rubidium chloride technique (36). Plasmids were introduced in *E. chrysanthemi* by
14 electroporation (40) or conjugation (25). The insertions were integrated into the *E. chrysanthemi*
15 chromosome by marker exchange recombination after successive cultures in low phosphate
16 medium in the presence of the appropriate antibiotic (38) or in medium containing sucrose 5%
17 when pOK plasmid was used as the vector (25).

18 Transduction of *E. chrysanthemi* with phage Φ EC2 was carried out according to Resibois et al.
19 (35).

20 **Purification of the 1,4- β -endogalactanase.** The periplasmic content of *E. chrysanthemi* cells
21 was extracted by the chloroform method in Tris-HCl 20 mM pH8, 0.1 M NaCl buffer (1). The
22 sample (5 mg of proteins) was loaded onto a Superdex 75 HR10/30 gel filtration column
23 (Amersham Biosciences). Proteins were eluted in the same buffer and fractions were assayed for
24 1,4- β -endogalactanase activity with the chromogenic substrate AZO-galactan (Megazyme, Bray,
25 Ireland). 1,4- β -endogalactanase containing fractions were pooled (approximately 50 ml), loaded

1 onto a MonoQ HR5/5 anion exchange chromatography column (Amersham Biosciences) and
2 eluted with a linear 0.1 to 1 M NaCl gradient. The 1,4- β -endogalactanase activity was recovered
3 in the void volume. The protein fractions were analysed by SDS-PAGE 10%. The protein
4 concentration was determined by the Bradford test using BSA as a standard (8).

5 **Determination of enzyme activities.**

6 1,4- β -endogalactanase activity was determined by hydrolysis of AZO-galactan according to the
7 manufacturer. The reaction mixture consisted of sodium acetate buffer 0.2 M pH 5.8 and AZO-
8 galactan 0.5%. After incubation at 50°C for 15 min, the reaction was stopped by addition of 1 ml
9 ethanol 95%. After 10 min at room temperature, a 10 min centrifugation at 1000 x g allowed
10 precipitation of high molecular weight polymers. Absorbance of oligomers in the supernatant was
11 measured at 590 nm. Activity of purified 1,4- β -endogalactanase was assayed at different pH and
12 temperature. The optimum pH was determined by incubation in buffered solutions (0.2 M) of
13 sodium acetate, potassium phosphate or Tris-HCl, depending on the pH. The optimum
14 temperature was determined by incubation in sodium acetate 0.2 M pH 5.8 at temperature
15 ranging from 23 to 70°C.

16 β -galactosidase and β -glucuronidase assays were performed on crude extracts obtained from
17 bacteria disrupted by passage through a French Press cell at 1.4×10^7 Pa (20000 psi). β -
18 galactosidase and β -glucuronidase activities were determined by monitoring spectrometrically at
19 410 nm the hydrolysis of the ONPG (orthonitrophenyl- β -D-galactoside) or PNPU (4-nitrophenyl-
20 β -D-glucuronide), respectively.

21 **MALDI-TOF.** MALDI-TOF spectrometry was performed with Voyager-DE STR PRO (Applied
22 Biosystems, Framingham) in the positive mode with DHB (2,3-dihydroxybenzoic acid) matrix.

23 **Pathogenicity test.** Chicory leaves were inoculated as previously described (20) with slight
24 modifications. Bacteria from an overnight culture in LB medium were recovered by
25 centrifugation and diluted in M63 medium. Prior inoculation, the leaves were slightly wounded in

1 their centre with a sterile pipette tips. Ten leaves were infected for each strain using 10^7 bacteria
2 per inoculation site. After incubation in a dew chamber for 24 hours at 30°C, the length of rotted
3 tissue was measured to estimate the disease severity. Bacterial cell numerations were performed
4 by dilution plating to estimate the bacterial multiplication. In parallel, β -glucuronidase assays
5 were performed on the macerated tissues to assess the expression of the gene fusions during plant
6 infection. Specific activity is expressed as μmol of product liberated per min per 10^{10} bacteria.
7 Potato tubers and plants of *Saintpaulia ionantha* (African violets) were inoculated as previously
8 described (20).

9 **Sequence data.** The sequence of *ganA* (ABF-0018196), *ganB* (ABF-0018198), *ganC* (ABF-
10 0018199), *ganE* (ABF-0018192), *ganF* (ABF-0018193), *ganG* (ABF-0018195), *ganK* (ABF-
11 00190), *ganL* (ABF-0018200) and *ganR* (ABF-0018202) are available at the
12 <http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/ASAP1.htm> site.

13 RESULTS

14 **Identification of the *gan* locus.** Two recent proteomic studies performed on the *E. chrysanthemi*
15 3937 strain revealed the presence of an abundant protein (AFB-0018196) of unknown function
16 (2, 7). Its primary sequence suggested that this protein is a member of the glycoside hydrolase
17 family GH53 (17, 18). This protein showed a high degree of similarity with putative β -1,4-
18 endogalactanases from *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* (83%) and
19 *Erwinia carotovora* (78%). Sequence analysis revealed that the corresponding gene belongs to a
20 cluster of 9 genes which are also conserved in the five bacterial species. This cluster encodes a
21 putative utilization system of oligosaccharides. We postulated that this cluster was responsible
22 for the uptake and catabolism of galactan in *E. chrysanthemi* and we named these genes *gan*. The
23 cluster appeared organized in four operons: *ganR*, *ganL*, *ganEFGABC* and *ganK* (Fig. 1). This
24 locus is conserved, with the same genetic organization in members of the *Yersinia* genus (*Y.*
25 *pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*). In *E. carotovora*, *ganR* is absent and *ganL* is

1 located on the other side of the cluster and transcribed in the opposite direction (Fig. 1). In these
2 bacteria, no additional gene conservation was observed for the genes adjacent to this locus,
3 suggesting that the *gan* genes constitute a functional unit.

4 The gene *ganA* encodes the putative β -1,4-endogalactanase. The gene *ganB* encodes a protein
5 showing strong similarities with putative β -galactosidases of many bacterial species including *Y.*
6 *pestis* (84%), *E. carotovora* (83%), *Bacillus circulans* (76%) or *Clostridium perfringens* (72%).
7 The primary sequence of GanB suggested that this protein is a member of the glycoside
8 hydrolase family GH42 (17, 18). *ganC* is a partial gene that could encode a truncated polypeptide
9 (106 amino acids) homologous to the N-terminal part of the glucose-specific enzyme IIBC of a
10 phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) from many bacterial species.
11 No function could be assigned to this gene despite the fact that it is conserved among bacterial
12 species containing the *gan* locus (87% and 75% similarity with *Y. pestis* and *E. carotovora*,
13 respectively). Five genes, *ganL*, *ganE*, *ganF*, *ganG* and *ganK* could be involved in the transport
14 of galactan in *E. chrysanthemi*. They were related to the maltose/maltodextrine transport system
15 in *E. coli* and named according to their homolog of this system (6). The gene *ganL* encodes a 403
16 amino acid outer membrane protein homologous (48% similarity) to LamB, the outer membrane
17 porin specific for maltose. The four other genes encode the elements of an ATP binding cassette
18 (ABC) transporter. The gene *ganE* encodes a 415 amino acid periplasmic binding protein with
19 45% similarity to the maltose periplasmic binding protein MalE. *ganF* and *ganG* encode the two
20 subunits of the inner membrane permease (435 and 299 amino acids) which showed 62% and
21 56% similarities to MalF and MalG, respectively. The gene *ganK* encodes a 369 amino acid
22 ATPase sharing 65% of similarity with the ATPase MalK (see supplementary table for additional
23 information). In addition, the gene *ganR* encodes a protein of 357 amino acids homologous to
24 transcriptional regulators of the LacI family. Its best similarity score (42%) is with LacI, the
25 repressor of the lactose operon in *E. coli*.

1 **Characterization of the GanA enzyme.** The wild-type strain and its *ganA* derivative mutant
2 were grown on glycerol minimal medium containing AZCL-galactan, a specific substrate for the
3 detection of 1,4- β -endogalactanase activity. After 16 h at 30°C, only wild-type strain colonies
4 were surrounded by a blue halo indicating the degradation of the AZCL-galactan substrate. The
5 colonies of the mutant did not degrade AZCL-galactan, demonstrating that *ganA* indeed encodes
6 a 1,4- β -endogalactanase.

7 The *ganA* gene encodes a predicted polypeptide of 400 amino acids. The Psort
8 (<http://psort.nibb.ac.jp/>) and SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) algorithms (4)
9 predicted that GanA contains a N-terminal signal peptide of 22 amino acids with a cleavage site
10 between two alanine residues, suggesting that the mature GanA is an exported protein. To clarify
11 the cellular localization of GanA, we tested the 1,4- β -endogalactanase activity of sub-cellular
12 fractions. After centrifugation of the wild-type cells, all the activity was detected in the cell pellet
13 while no activity could be detected in the supernatant (data not shown). After treatment of the
14 bacterial pellet with chloroform, more than 90% of the 1,4- β -endogalactanase activity was
15 recovered in the periplasmic extract, demonstrating that GanA is a periplasmic protein. This
16 periplasmic location is confirmed by previous proteomic studies of *E. chrysanthemi*. GanA was largely
17 recovered among the soluble proteins (2) and weakly in the membrane fraction (7) but not among the
18 extracellular proteins (27).

19 GanA was purified to electrophoretic homogeneity after preparation of periplasmic extracts
20 fractionated by size exclusion chromatography and anion exchange chromatography (Fig. 2A). A
21 67 fold purification rate was obtained. The apparent size of the mature GanA enzyme estimated
22 by SDS-PAGE is in agreement with the size of the mature protein deduced from the primary
23 sequence (41800 Da).

24 The optimal activity of the purified endogalactanase was found to be at 50°C (+/- 5°C) (Fig. 2B)
25 in a 15 min assay, with AZO-galactan as a substrate in 0.2 M sodium acetate buffer at pH 5.8.

1 This temperature is 20°C above the optimal growth temperature of *E. chrysanthemi* (30°C) where
2 the enzyme showed 30% of its maximal activity. The enzyme displayed significant activity over a
3 broad pH ranging from 5 to 8, with an optimum near pH 6 (Fig. 2C).

4 Analysis of the products obtained by *in vitro* degradation of pectic galactans by GanA at 50°C in
5 a 0.2 M sodium acetate buffer at pH 5.8 was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF
6 MS) after digestions of 15, 30, 60, and 120 min (Fig. 3). For each reaction time, four
7 oligogalactans hydrolysis products were detected in an identical relative percentage.
8 Galactotriose (gal₃), galactotetraose (gal₄), galactopentaose (gal₅) and galactohexaose (gal₆) were
9 obtained at approximate ratios of 20%, 65%, 15% and less than 5%, respectively. Neither
10 galactose nor galactobiose could be detected. After 10 h of reaction, the distribution pattern of
11 oligosaccharides remained the same (data not shown). These results indicated that the GanA is an
12 endo-acting enzyme.

13 The *ganA* mutant and the wild-type strain were grown during 24h on minimal medium containing
14 0.2% (measured in equivalent galactose) galactose, pectic galactans or oligogalactans (obtained
15 by *in vitro* hydrolysis of pectic galactans with GanA) as the sole carbon source (Table 4). The
16 growth yield was the same for both strains when they were grown in minimal medium containing
17 galactose. The *ganA* mutant was unable to grow in minimal medium containing pectic galactan as
18 the sole carbon source, indicating that the periplasmic endogalactanase is necessary for galactan
19 utilization. The growth yield of the *ganA* mutant on oligogalactans was about 20% of that
20 obtained with the wild-type strain, even after a 72h incubation time. Thus, a large part of the
21 oligogalactans could not be used *in vivo* by the *ganA* mutant. A hypothesis is that a polar effect of
22 the *ganA* mutation on *ganB* is responsible for a reduction of the GanB activity (see below). All
23 these data demonstrate that GanA catalyzes the cleavage of galactans into oligogalactans that
24 could enter the cytoplasm.

25 **Characterization of the GanB enzyme.** By analysis of the lactose catabolism in *E.*

1 *chrysanthemi*, two genes, *lacZ* and *lacB*, has been reported to encode cytoplasmic enzymes with
2 a β -galactosidase activity (21). Analysis of the *E. chrysanthemi* genome revealed two potential β -
3 galactosidase genes, *ganB* and *lacZ*, encoding a protein of the GH42 family, homologous to the
4 *E. coli* β -galactosidase LacZ. Thus, *lacB* and *ganB* may be the same gene. To test this hypothesis
5 and the part of each enzyme in the total β -galactosidase activity of *E. chrysanthemi*, the wild-type
6 strain and its *lacZ* (NFB3680), *ganB* (NFB3666), and *ganB*, *lacZ* (NFB3687) derivatives were
7 assayed with ONPG as a substrate (Table 5). No β -galactosidase activity was detected in the
8 *ganB*, *lacZ* double mutant. More than 90% of β -galactosidase activity was recovered in the *lacZ*
9 mutant and less than 5% was detected in the *ganB* mutant. These results indicated that *lacB* and
10 *ganB* are the same gene and that GanB supports the main β -galactosidase activity in *E.*
11 *chrysanthemi*. In addition, β -galactosidase activity in the *ganA* or *ganE* mutants showed about
12 20% of the level obtained in the wild-type strain, indicating that these mutations exert a partial
13 polar effect on *ganB*. Growth of the *ganB* and *lacZ* mutants was tested on agar minimal medium
14 containing pectic galactan as the sole carbon source (data not shown). While normal growth
15 occurred for the *lacZ* mutant, no growth was observed for the *ganB* mutant indicating that GanB,
16 but not LacZ, is required for galactans utilization. In addition, the *ganB* mutant was unable to
17 grow on oligogalactans obtained after in vitro hydrolysis of galactans by GanA (Table 4). These
18 results support the assumption that GanB is a cytoplasmic exogalactanase involved in the
19 cleavage of the oligogalactans liberated by GanA.

20 **Characterization of the ABC transport system of galactans.** The EC3937 wild-type strain is
21 able to grow on galactose or galactans as a carbon source but it was found unable to use
22 galactobiose for growth (see Materials and Methods). To determine if products of the *gan* cluster
23 are involved in galactans transport, the growth yields of mutants affected for *ganL* (predicted to
24 encode a porin), *ganE* and *ganK* (predicted to encode periplasmic protein and ATPase of the
25 ABC transport system, respectively) were compared with that of the wild-type strain in minimal

1 medium with galactose, galactans or oligogalactans as carbon sources (Table 4). All strains gave
2 the same growth yield with galactose as a carbon source, indicating that the *gan* system has no or
3 a minor role in galactose transport. The *ganE* and *ganK* mutants were not able to grow on
4 galactans or on oligogalactans. Thus, these two elements of the Gan ABC transporter are
5 necessary for uptake of these oligosaccharides. Since GanA is a periplasmic enzyme responsible
6 for galactan cleavage, the Gan ABC transport system is certainly responsible for the uptake of
7 oligogalactans across the inner membrane rather than that of galactans. The *ganL* mutant was not
8 able to assimilate galactan and showed a reduced growth on oligogalactans. This low growth
9 probably resulted of the transport of the small oligomers such as gal₃, which could diffuse
10 through a non specific porin. These data suggested that GanL is a specific porin for uptake of
11 galactans across the outer membrane.

12 **Effect of carbon source on the expression of the *E. chrysanthemi* *gan* genes.** To determine the
13 regulation of the genes involved in galactan utilization, transcriptional fusions of the *ganA*, *ganB*,
14 *ganE*, *ganK* and *ganL* genes with the *uidA* gene (encoding the β -glucuronidase) were constructed
15 and introduced into *E. chrysanthemi* by reverse genetic. The β -glucuronidase activity of the
16 fusions was measured after growth until mid-log phase in minimal medium with glycerol,
17 galactose, glucose or sucrose as a carbon source (Fig. 4). In the presence of glucose or sucrose,
18 the expression decreased by 3-fold (*ganB*) to 7-fold (*ganL*) factors as compared to the expression
19 in the presence of galactose or glycerol. This suggested that the *gan* locus is under catabolic
20 repression controlled by the cAMP receptor protein, CRP, as described for several genes of *E.*
21 *chrysanthemi* involved in plant cell wall degradation (22). A potential consensus sequence for
22 CRP binding (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/cgi/consensus2.cgi>) was found upstream of the
23 3 transcriptional units of the *gan* locus (Fig. 1). To test this regulation, an *E. chrysanthemi*
24 *crp::Cml* mutation was transduced into strains containing *ganK::uidA*, *ganE::uidA* and
25 *ganL::uidA* fusions using the phi-EC2 transducing phage. In the presence of the *crp* mutation, a

1 3- and 5-fold decrease was observed for *ganK* and *ganE* expression and an 80-fold decrease was
2 observed for *ganL* expression, indicating that the *gan* locus is under catabolic repression (Fig. 5).

3 **GanR is a regulator of the *gan* genes.** The presence of the regulatory gene *ganR* in the *gan*
4 locus and the conservation of this gene in the *gan* loci of *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *E.*
5 *carotovora* and *Klebsiella pneumoniae* suggested that GanR is involved in the regulation of
6 transcription of the *gan* genes. To test this hypothesis, an *E. chrysanthemi ganR::Cml* mutant was
7 constructed by reverse genetics. The *ganR::Cml* mutation was then transduced into strains
8 containing *ganK::uidA* and *ganE::uidA* fusions using the phi-EC2 transducing phage. About 60%
9 of cotransduction was found between the Kan^R and Cml^R mutations, as expected for mutations
10 separated by about 10 kb (24).

11 GanR belongs to the LacI family of transcriptional regulators. In the presence of the *ganR*
12 mutation, the expression of *ganK* or *ganE* decreased by 8- and 5-fold factors, respectively (Table
13 6). This diminution suggested that GanR is an activator of *ganK* and *ganE* expression. The assay
14 of β -galactosidase activity in the *ganR* mutant confirmed the decreased expression of *ganB* in this
15 genetic context (Table 5). Thus, GanR acts as an activator to control the synthesis of the proteins
16 involved in galactan degradation in *E. chrysanthemi*.

17 ***gan* genes are expressed during plant infection.** The expression of *ganA* and *ganE*
18 transcriptional fusions was analyzed during the infection of chicory leaves, and compared to that
19 of the well inducible pectate lyase gene *pelD* (23). We observed that both *ganA* and *ganE* were
20 transcribed at a high level in the macerated tissue (Fig. 6B); their expression appeared clearly
21 higher than that of the *pelD* gene. Thus, the *gan* genes are expressed during plant infection.

22 **The *gan* mutants are virulent.** We tested the extent of soft-rot caused by different mutants after
23 inoculation of potato tubers, chicory leaves and *Saintpaulia ionantha*. The maceration provoked
24 by the *ganR*, *ganA* and *ganE* mutants on chicory leaves was compared to that caused by the
25 parental strain 3937. There was no significant difference in the degree of maceration caused by

1 each strain (Fig. 6A). Moreover, the *gan* mutations did not affect the bacterial growth in the plant
2 tissue (data not shown). Similarly, *ganA* and *ganR* mutants were not affected for virulence on
3 potato tubers or plants of *Saintpaulia ionantha* (data not shown). These results showed that
4 galactan degradation is not essential for the maceration or for the development of the soft-rot
5 disease.

6

7

DISCUSSION

8 In this paper, we described the functional characterization of a locus involved in the utilization of
9 galactans by *E. chrysanthemi*. Previous studies showed that *E. chrysanthemi* is able to degrade
10 and catabolize a range of plant structural polysaccharides, including linear regions of pectin and
11 the backbone of the ramified regions RGI (20, 22, 29). Galactans are constituents of the side
12 chains attached to RGI. Among the eight genes identified in the *gan* locus, five are involved in
13 transport. Four genes (AFB-0018190, AFB-0018192, AFB-0018193, and AFB-0018195) encode
14 one of the 86 putative ABC transport systems annotated in the *E. chrysanthemi* 3937 genome.
15 One gene (AFB-0018200) encodes a porin, improperly annotated as LamB (2) since *E.*
16 *chrysanthemi* is not sensitive to phage lambda and it is unable to use maltose or maltodextrine as
17 carbon source for growth. The two other *gan* genes (AFB-0018196 and AFB-0018198) encode
18 glycoside hydrolases of the family GH53 and GH42, respectively. These enzymes are involved in
19 the degradation from galactans to galactose. The last gene, *ganR* (AFB-0018202), encodes a
20 transcriptional regulator. The *gan* locus allows *E. chrysanthemi* to use galactan as sole carbon
21 and energy source for growth. The *gan* locus is conserved, complete and with the same genetic
22 organization, in *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. This conservation suggests
23 that various *Yersinia* species have also the capacities to transport and catabolize galactan. In *E.*
24 *carotovora*, all the *gan* genes are present, except *ganR* which encodes the regulator. Thus, the
25 *gan* genes are submitted to a different regulation in the two *Erwinia* species.

1 Data presented in this study suggest the following model for galactan transport and catabolism.
2 After the digestion of pectin by the set of *E. chrysanthemi* pectic enzymes, the galactan chains are
3 liberated and diffuse across the outer membrane through the porin GanL. In the periplasm, GanA
4 produces small oligosaccharides that are taken up by GanE, the oligogalactan binding protein.
5 The transport of these oligomers across the inner membrane is performed by the GanFGK₂
6 complex. The cytoplasmic enzyme GanB further degrades the oligogalactans into galactose
7 which subsequently enters the cellular metabolism.

8 The *ganA* gene encodes a periplasmic β -1,4-endogalactanase. In vitro, the purified enzyme
9 catalyses the degradation of galactans into oligogalactans from gal₃ to gal₆ with a majority of
10 gal₄. Neither galactobiose nor galactose were recovered. Thus, GanA cannot hydrolyze short
11 oligomers such as gal₂ or gal₃, as observed for the β -1,4-endogalactanase of *Bacillus*
12 *licheniformis* (39). Despite the fact that they belongs to the GH53 family, the mode of action of
13 β -1,4-endogalactanases may be different. The endogalactanase of *Bifidobacterium longum*
14 probably acts by a processive mechanism, liberating the same products along the reaction (19);
15 this major product is gal₃ but galactose and galactobiose are formed after prolonged incubation.
16 In *Aspergillus aculeatus*, end products are galactobiose and galactose with intermediates of larger
17 size (11). Various cellular locations were also observed for β -1,4-endogalactanases. An
18 extracellular location allows the endogalactanase to directly degrade galactans linked to pectin, as
19 it was observed for the enzymes of *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens* or *B. subtilis* (12,
20 9, 42). In *B. longum*, this enzyme is extracellular but anchored to the membrane (19) and the *E.*
21 *chrysanthemi* β -1,4-endogalactanase is located in the periplasm. These locations suggest that
22 galactan utilization depends on the previous liberation of the polysaccharidic chains from RGI by
23 pectic enzymes. The role of these cell-linked enzymes is to degrade polymers into oligomers able
24 to cross the inner membrane. The periplasmic α -amylase MalS of *E. coli*, catalyzing the

1 degradation of maltodextrines into maltotriose, maltose and glucose, plays an analogous role in
2 the maltodextrines utilization (14).

3 *E. chrysanthemi* mutants affected for *ganL*, *ganK*, *ganE*, *ganA* or *ganB* became unable to
4 catabolize galactan. The *ganK*, *ganE* or *ganB* mutants are also unable to grow on a mixture of
5 oligogalactans (gal₃ to gal₆) produced by the action of GanA in vitro. When *ganL* or *ganA*
6 mutants were grown on oligogalactans produced by GanA, the low growth yield observed
7 approximately corresponds to the use of gal₃. The GanFGK₂ transport system probably
8 recognizes preferentially galactotriose, suggesting that it is the major product released by GanA
9 in vivo. The cytoplasmic enzyme GanB has a β -1,4-exogalactanase (or β -galactosidase) activity
10 which is necessary to degrade gal₃. Endogalactanases unable to produce galactose as a final
11 product need to be associated with exogalactanases. This explains the conserved association of
12 genes encoding endogalactanases of the family GH53 and β -galactosidases of the family GH42
13 observed in *B. subtilis* and other bacteria (42).

14 The expression of the *E. chrysanthemi* *gan* genes is controlled by both the general catabolic
15 repression and by a specific regulator since *crp* and *ganR* mutations decrease *gan* gene
16 expression. Many bacterial regulons needed for nutrition by carbohydrates depend on such
17 regulations. Despite the fact that GanR belongs to the LacI family of regulators, which mainly
18 includes repressors, it appears to act as an activator of the *gan* expression. However, the level of
19 *gan* expression is high in all the conditions tested and the effect of the GanR activation is weak.

20 In addition, two independent proteomic analyses revealed a high level of the galactanase GanA
21 after growth of strain 3937 in LB medium (6) or in M63 (2). Thus, we cannot exclude that the
22 *gan* gene expression presents some degree of deregulation in the *E. chrysanthemi* strain 3937.

23 The Mal and Gan systems are analogous but exhibit two fundamental differences. In the Gan
24 system, the degrading enzymes are glycosyl hydrolases. A blast search against the complete *E.*
25 *chrysanthemi* 3937 genome sequence did not detect a MalT homolog.

1 The *gan* mutants showed normal growth and maceration *in planta*. The *gan* genes are expressed
2 during infection but their expression is not essential for the *E. chrysanthemi* virulence. It was
3 observed that the degradation of cellulose, another important plant cell wall polysaccharide, is not
4 necessary for virulence (5). Similarly, the xylanase of the *E. chrysanthemi* strain D1 is not
5 involved in its virulence (28). Thus, pectic degrading enzymes (essentially the *pel* gene products)
6 are the sole cell wall degrading enzymes required for the *E. chrysanthemi* virulence since they
7 provoke tissue maceration (41). Such as cellulose and xylan, galactans are probably used as a
8 secondary carbon source. These polysaccharides may be used as additional nutriment at the end
9 of the infection process. The capacity of *E. chrysanthemi* to use a wide range of plant
10 components may also favor its saprophytic life since it has the possibility to assimilate plant
11 remnants present in the soil.

12 13 ACKNOWLEDGEMENTS

14 This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and
15 from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

16 We acknowledge members of the International *Erwinia* Consortium for the exchange of
17 unpublished data concerning the *E. chrysanthemi* 3937 genome sequence. We thank Geraldine
18 Effantin and Marie-Christine Slomianny for assistance with some experiments.

19 20 REFERENCES

- 21 1. Ames, G. F., C. Prody, and S. Kustu. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of
22 periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* **160**:1181-1183.
- 23 2. Babujee, L., B. Venkatesh, A. Yamazaki, and S. Tsuyumu. 2007. Proteomic analysis of the carbonate
24 insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*)
25 strain 3937. *J. Proteome Res.* **6**: 62-69.

- 1 3. **Bardonnet, N., and C. Blanco.** 1992. *'uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion
2 mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:243-247.
- 3 4. **Bendtsen, J. D., Henrik N. G. von Heijne and S. Brunak.** 2004. Improved prediction of
4 signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**:783-795.
- 5 5. **Boccaro, M., Aymeric, J. L., and C. Camus.** 1994. Role of endoglucanases in *Erwinia*
6 *chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bacteriol.* **176**:1524-1526.
- 7 6. **Boos, W., and H. Shuman.** 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport,
8 metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:204-229.
- 9 7. **Bouchart, F., A. Delangle, J. Lemoine, J.-P. Bohin, and J.-M. Lacroix.** 2007. Proteomic analysis of a
10 non virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated
11 periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general
12 metabolism. *Microbiology* **153**: 760-767.
- 13 8. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
14 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- 15 9. **Braithwaite, K. L., T. Barna, T. D. Spurway, S. J. Charnock, G. W. Black, N. Hughes, J.**
16 **H. Lakey, R. Virden, G. P. Hazlewood, B. Henrissat, and H. J. Gilbert.** 1997. Evidence that
17 galactanase A from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* is a retaining family 53
18 glycosyl hydrolase in which E161 and E270 are the catalytic residues. *Biochemistry.* **49**:15489-
19 15500.
- 20 10. **Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R
21 and Kan^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance
22 determinant. *Gene* **158**:9-14.
- 23 11. **Christgau, S., T. Sandal, L. V. Kofod, and H. Dalboge.** 1995. Expression cloning,
24 purification and characterization of a beta-1,4-galactanase from *Aspergillus aculeatus*. *Curr.*
25 *Genet.* **27**:135-141.

- 1 12. **de Vries, R. P., L. Parenicova, S. W. A. Hinz, H. C. M. Kester, G. Beldman, J. A. E.**
2 **Benen, and J. Visser.** 2002. The β -1,4-endogalactanase A from *Aspergillus niger* is specifically
3 induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of
4 pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.* **269**:4985-4993.
- 5 13. **Emi, S., J. Fukumoto, and T. Yamamoto.** 1972. Crystallization and some properties of
6 mannanases. *Agric. Biol. Chem.* **36**:991-1001.
- 7 14. **Freundlieb, S., and W. Boos.** 1986. α -amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of
8 the structural gene, *mals*, and identification of its products as a periplasmic protein. *J. Biol.*
9 *Chem.* **261**:2946-2953.
- 10 15. **Gelfand, M. S., and O. N. Laikova.** 2003. Prolegomena to the evolution of transcriptional
11 regulation in bacterial genomes, p. 195-216. *In* E. V. Kooning, and M. Y. Galperin (ed.),
12 *Frontiers in computational Genomics.* Wymondham, Caister Academic Press.
- 13 16. **Glasner J. D., C.- H. Yang, S. Reverchon, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G.**
14 **Condemine, J.-P. Bohin, F. van Gijsegem, S. Yang, T. Franza, D. Expert, G. Plunkett,**
15 **M. San Francisco, A. Charkowski, B. Py, L. Grandemange, K. Bell, L. Rauscher, P.**
16 **Rodriguez-Palenzuela, A. Toussaint, M. Holeva, S.- Y. He, V. Douet, M. Boccara, C.**
17 **Blanco, I. Toth, A. D. Anderson, B. Biehl, B. Mau, S. M. Flynn, F. Barras, M.**
18 **Lindeberg, P. Birch, S. Tsuyumu, X. Shi, M. Hibbing, M.- N. Yap, U. Masahiro, J. F.**
19 **Kim, P. Soni, G. F. Mayhew, D. Fouts, S. Gill, F. R. Blattner, N. T. Keen, and N. T.**
20 **Perna.** Collaborative annotation and analysis of the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genome.
21 Submitted.
- 22 17. **Henrissat, B.** 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.
23 *Biochem. J.* **280**:309-316.
- 24 18. **Henrissat, B., and A. Bairoch.** 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on
25 amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**:781-788.

- 1 19. Hinz, S. W., M. I. Pastink, L. A. Van den Broek, J. P. Vincken, and A. G. Voragen.
2 2005. *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans.
3 Appl. Environ. Microbiol. **71**:5501-5510.
- 4 20. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. The RhaS activator controls the *Erwinia chrysanthemi*
5 3937 genes *rhiN*, *rhiT* and *rhiE* involved in rhamnogalacturonan catabolism. Mol. Microbiol.
6 **51**:1361-74.
- 7 21. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and J. Robert-Baudouy. 1985. Lactose metabolism in
8 *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **162**:248-255.
- 9 22. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser, and S. Reverchon. 1996.
10 Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. **50**:213-257.
- 11 23. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., H. Dominguez, and J. Robert-Baudouy. 1992.
12 Environmental conditions affect the transcription of the pectinases gene of *Erwinia chrysanthemi*
13 3937. J. Bacteriol. **174**:7807-7018.
- 14 24. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., S. Reverchon, and J. Robert-Baudouy. 1989. Expanded
15 linkage map of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. Mol. Microbiol. **5**:573-581.
- 16 25. Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas*
17 *campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-
18 specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol. **29**:1379-1390.
- 19 26. Hwang, J., Y. R. Pyun, and J. L. Kokini. 1993. Sidechains of pectins: some thoughts on
20 their role in plant cell walls and foods. Food Hydrocolloids **7**:39-53.
- 21 27. Kazemi-Pour N., G. Condemine, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 2004. The secretome of the plant
22 pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. Proteomics **10**:3177-3186.
- 23 28. Keen, N. T., Boyd, C., and B. Henrissat. 1996. Cloning and characterization of a xylanase
24 gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant Microbe Interact. **9**:651-657.
- 25 29. Laatu, M., and G. Condemine. 2003. Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the

- 1 Out system in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **185**:1642-1649.
- 2 30. **Lazan, H., S. Y. Ng, L. Y. Goh, and Z. M. Ali.** 2004. Papaya β -galactosidase/galactanase
3 isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. Plant Physiol.
4 Biochem. **42**:847-853.
- 5 31. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook
6 for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 7 32. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1998. A novel suicide vector and its use in construction
8 of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in
9 *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. **170**:2575-2583.
- 10 33. **Nakamura, A., H. Maeda, M. Mizuno, Y. Koshi, and Y. Nagamatsu.** 2003. β -
11 Galactosidase and its significance in ripening of "Saijyo" *japanese persimmon* fruit. Biosci.
12 Biotechnol. Biochem. **67**:68-76.
- 13 34. **Perombelon, M., and A. Kelman.** 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annu. Rev.
14 Phytopathol. **18**:361-387.
- 15 35. **Resibois, A., M. Colet, M. Faelen, T. Schoonejans, and A. Toussaint.** 1984. Phi-EC2, a
16 new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. Virology **137**:102-112.
- 17 36. **Reverchon, S., D. Expert, J. Robert-Baudouy, and W. Nasser.** 1997. The cyclic AMP
18 receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol.
19 **179**:3500-3508.
- 20 37. **Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and D. Mohnen.** 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and
21 oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry. **57**:929-967.
- 22 38. **Roeder, D. L., and A. Collmer.** 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase
23 isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. **164**:51-56.
- 24 39. **Ryttersgaard, C., J. Le Nours, L. Lo Leggio, C. T. Jorgensen, L. L Christensen, M.
25 Bjornvad, and S. Larsen.** 2004. The structure of endo- β -1,4-galactanase from *Bacillus*

- 1 *licheniformis* in complex with two oligosaccharide products. J. Mol. Biol. **341**:107-117.
- 2 40. **Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory
3 manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 4 41. **Sepulchre, J.-A., S. Reverchon, and W. Nasser.** 2007. Modeling the onset of virulence in a
5 pectinolytic bacterium. J. Theor. Biol. **244**:239-257.
- 6 42. **Shipkowski, S., and J. E. Brenchley.** 2006. Bioinformatic, genetic, and biochemical
7 evidence that some glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases are arabinogalactan type I
8 oligomer hydrolases. Appl. Environ. Microbiol. **72**:7730-7738.
- 9 43. **Spiro, R. G.** 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. Methods Enzymol. **8**:3-27.
- 10 44. **Vincken, J. P., H. A. Schols, R. J. F. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. J.**
11 **Voragen, and R. G. F. Visser.** 2003. If homogalacturonan were a side chain of
12 rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. Plant. Physiol. **132**:1781-1789.
- 13 45. **Yang, H., H. Ichinose, M. Yoshida, M. Nakajima, H. Kobayashi, and S. Kaneko.** 2006.
14 Characterization of a thermostable endo- β -1,4-D-galactanase from the hyperthermophile
15 *Thermotoga maritima*. Biosci Biotechnol Biochem. **70**:538-541.
- 16 46. **Zhu, Y., F. Pettolino, S. L. Mau, and A. Bacic.** 2005. Characterization of cell wall
17 polysaccharides from medicinal plant *Panax notoginseng*. Phytochemistry **66**:1067-1076.

1 **FIGURE LEGENDS**

2 FIG. 1. Genetic organization of the *gan* locus of *E. chrysanthemi*, *Y. pseudotuberculosis* and *E.*
3 *carotovora*. Arrows indicate the localization of open reading frames and the direction of gene
4 transcription. Gene designation is given below each arrow.

5
6 FIG. 2. Analysis of the purified GanA enzyme. SDS-PAGE of purified GanA (A). Lane 1,
7 protein size markers; lane 2, purified GanA. Activity of the purified GanA enzyme in function of
8 temperature (B) and pH (C).

9
10 FIG. 3. Products of galactan degradation by GanA. Mass spectrum (MALDI-TOF MS) analysis
11 of oligogalactans produced by hydrolysis of galactans by GanA during 30 min (A) and their
12 relative percentage after 15 min, 30 min, 60 min and 120 min of hydrolysis (B).

13
14 FIG. 4. Expression of the *gan* genes depending on the carbon source. The *gan::uidA* fusions
15 strains were grown in M63 medium with either glucose, glycerol, galactose or sucrose as a
16 carbon source until mid-log phase. Cells were broken by passing through a French Press cell and
17 β -glucuronidase activity was measured with PNPU as a substrate. Specific activity is expressed
18 as nmol of PNP liberated per min and per mg of protein. Results reported are the average of 3
19 independent experiments.

20
21 FIG. 5. Expression of *ganA*, *ganK* and *ganL* fusions in a *crp* genetic background. The *crp*
22 *ganA::uidA*, *crp ganK::uidA* and *crp ganL::uidA* strains were grown until mild-log phase, broken
23 by passing through a French Press cell and β -glucuronidase activity was measured with PNPU as
24 a substrate. Specific activity is expressed as nmol of PNP liberated per min and per mg of
25 protein. Results reported are the average of 3 independent experiments.

1
2 FIG. 6. Infection of chicory leaves with the *gan* mutants. Ten chicory leaves were infected for
3 each strain, 3937 (wild-type), A4809 (*ganA::uidA*), A4810 (*ganE::uidA*) and A4863 (*ganR*). The
4 *pelD::uidA* mutant A4415, which has an attenuated virulence and a high *in planta* expression,
5 was used as control. After incubation at 30°C for 24 hours, the length of rotted tissue was
6 measured to estimate the disease severity (A). The macerated tissue was recovered and used for
7 the assay of the *uidA* product, β -glucuronidase (B). The values reported are the average of the
8 different leaves and the standard deviations are indicated.

1 TABLE 1. Bacterial strains

Strain of <i>E. chrysanthemi</i>	Relevant genotype	source or reference
3937	Wild type	Laboratory collection
NFB3666	EC3937, <i>ganB</i> ::Cml	This study
A2507	A350, <i>lmrTc</i> , <i>lacZ2 crp</i> ::Cml	(36)
NFB3677	3937, <i>crp</i> ::Cml	This study
A4809	3937, <i>ganA</i> :: <i>uidA</i> -Kan	This study
NFB3679	3937, <i>ganA</i> :: <i>uidA</i> -Kan, <i>crp</i> ::Cml	This study
NFB3680	3937, <i>lacZ</i> ::Cml	F. Bouchart
NFB3674	3937, <i>ganB</i> ::Cml	This study
NFB3681	3937, <i>ganB</i> ::FRT	This study
NFB3687	3937, <i>lacZ</i> ::Cml, <i>ganB</i> ::FRT	This study
NFB3701	3937, <i>ganK</i> :: <i>uidA</i> -Kan	This study
NFB3703	3937, <i>ganK</i> :: <i>uidA</i> -Kan, <i>crp</i> ::Cml	This study
A4868	3937, <i>ganL</i> :: <i>uidA</i> -Kan	This study
A4807	3937, <i>ganB</i> :: <i>uidA</i> -Kan	This study
A4810	3937, <i>ganE</i> :: <i>uidA</i> -Kan	This study
A4863	3937, <i>ganR</i> ::Cml	This study
A4415	3937, <i>pelD</i> :: <i>uidA</i> -Kan	(23)
<hr/>		
Strain of <i>E. coli</i>		
S17-1 λ pir	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , λ pir, RP4-2- <i>Tet</i> :: <i>Mu</i> -Kan:: <i>Tn7</i> (Tmp, Str)	(32)
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

1 TABLE 2. Plasmids

Plasmid	Genotype, phenotype	Source or reference
pBluescript II SK (+)	Amp ^R	Stratagene
pNFcml	Cml ^R	Laboratory collection
pUIDK11	Cml ^R , <i>uidA</i> -Kan	(3)
pGEM-T	Amp ^R	Promega
POK	<i>sacB</i> , <i>sacR</i> , <i>mobRK2</i> , <i>oriRK6</i> , Spe ^R	(10)
pCP20	FLP ⁺ , λ c1857 ⁺ , λ prRep ^{ts} , Amp ^R , Cml ^R	(10)
pI2872	pGEM-T, <i>ganA</i> ⁺	This study
pI2873	pGEM-T, <i>ganA::uidA</i> - Kan	This study
pI2874	pGEM-T, <i>ganB</i> ⁺	This study
pI2876	pGEM-T, <i>ganB::uidA</i> - Kan	This study
pI2866	pGEM-T, <i>ganE</i> ⁺	This study
pI2867	pGEM-T, <i>ganE::uidA</i> - Kan	This study
pI2868	pGEM-T, <i>ganL</i> ⁺	This study
pI2869	pGEM-T, <i>ganL::uidA</i> - Kan	This study
pI2870	pGEM-T, <i>ganR</i> ⁺	This study
pI3136	pGEM-T, <i>ganR::Cml</i>	This study
PNFW142	pBluescript, <i>ganB</i> ⁺	This study
PNFW145	pBluescript, <i>ganB::Cml</i>	This study
PNFW154	pOK, <i>ganB::Cml</i>	This study
PNFW162	POK, <i>ganB::FRT</i>	This study
pNF158	pBluescript, <i>ganK</i> ⁺	This study
pNF163	pBluescript, <i>ganK::uidA</i> - Kan	This study

2

3

4

1 TABLE 3. Primer sequences

Primer	Sequence*
ganAG	G <u>CGGATC</u> CTGACCTCAGGCAGTACCAAAG
ganAD	CGT <u>CTAGAC</u> CGGATTCAAAGGCGTAAATCG
ganBG	G <u>CGGATC</u> CTATGCTCTCTGCCTATTCAG
ganBD	CGT <u>CTAGAT</u> CAGATCAGACGGCGGCGAATC
ganKG	AA <u>ACTGCAG</u> GCCGGCATGACAAACCCCCTTTCGCCAGAA
ganKD	AA <u>ACTGCAG</u> CGCGTCGGTGAAGCTGTCTTGCTCGGCCTT
ganEG	G <u>CGGATC</u> CTCAACGGGTTATCAATACGG
ganED	CGT <u>CTAGAG</u> TGTCCTTGCTCCAGGTCG
ganLG	GC <u>AGATCT</u> GGATTGTAACAGCTGGTCC
ganLD	CGT <u>CTAGATA</u> ACCGGTCGGTGAGCGG
ganRG	G <u>CGGATC</u> CGGACCAGCTGTTACAATC
ganRD	CGT <u>CTAGAT</u> GCGCCGCAACATGCTAC

2 *Restriction sites are underlined

3

4

1 TABLE 4. Growth of wild-type and various *gan* mutants of *E. chrysanthemi*. Bacteria were grown on M63 me
 2 galactose, galactans or oligogalactans (Gal₃ to Gal₆) added as a carbon source (0.2%). The resulting growth yie
 3 as DO_{620nm} of the stationary growth phase

Strain	Growth on galactose	Growth on galactans	Growth on Gal3 to Gal6
3937	1	0.7	0.7
A4809 (<i>ganA</i>)	1	0	0.13
A4807 (<i>ganB</i>)	1	0	0
A4868 (<i>ganL</i>)	1	0	0.17
A4810 (<i>ganE</i>)	1	0	0
NFB3701 (<i>ganK</i>)	1	0	0
A4863 (<i>ganR</i>)	1	0.7	0.7

4

1 TABLE 5. β -galactosidase activity in the wild-type strain and various *gan* mutants of *E.*
2 *chrysanthemi*. Bacteria were grown in glycerol minimal medium at 30°C until mid-log phase,
3 broken by passing through a French Press cell and β -galactosidase activity was measured with
4 ONPG as a substrate. Results reported are the average of 3 independent experiments. Specific
5 activity is expressed as nmol of ONP liberated per min and per mg of protein

Strain	Main genotype	Specific activity
3937	wild-type	252
NFB3680	<i>lacZ</i>	241
A4807	<i>ganB</i>	7
NFB3687	<i>lacZ, ganB</i>	0
A4809	<i>ganA</i>	46
A4810	<i>ganE</i>	49
A4863	<i>ganR</i>	58

6

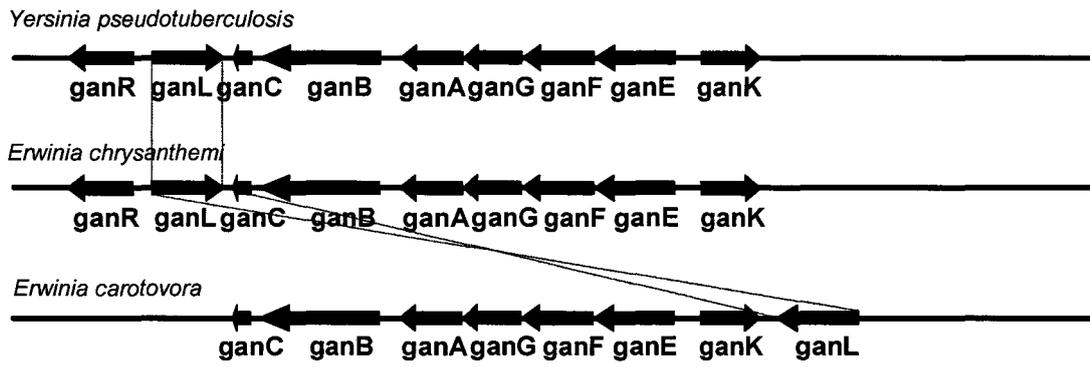
7

1 TABLE 6. Effect of the *ganR* mutation on *ganE* and *ganK* transcriptional fusions. Bacteria were
2 grown in glycerol minimal medium at 30°C. β -glucuronidase activity was measured with PNPU
3 as a substrate. Specific activity is expressed as nmol of PNP liberated per min and per mg of
4 protein. Results reported are the average of 3 independent experiments

Fusion	Regulatory mutation	β -glucuronidase specific activity
<i>ganE::uidA</i>	none	9374
	<i>ganR</i>	1158
<i>ganK::uidA</i>	none	13591
	<i>ganR</i>	2872

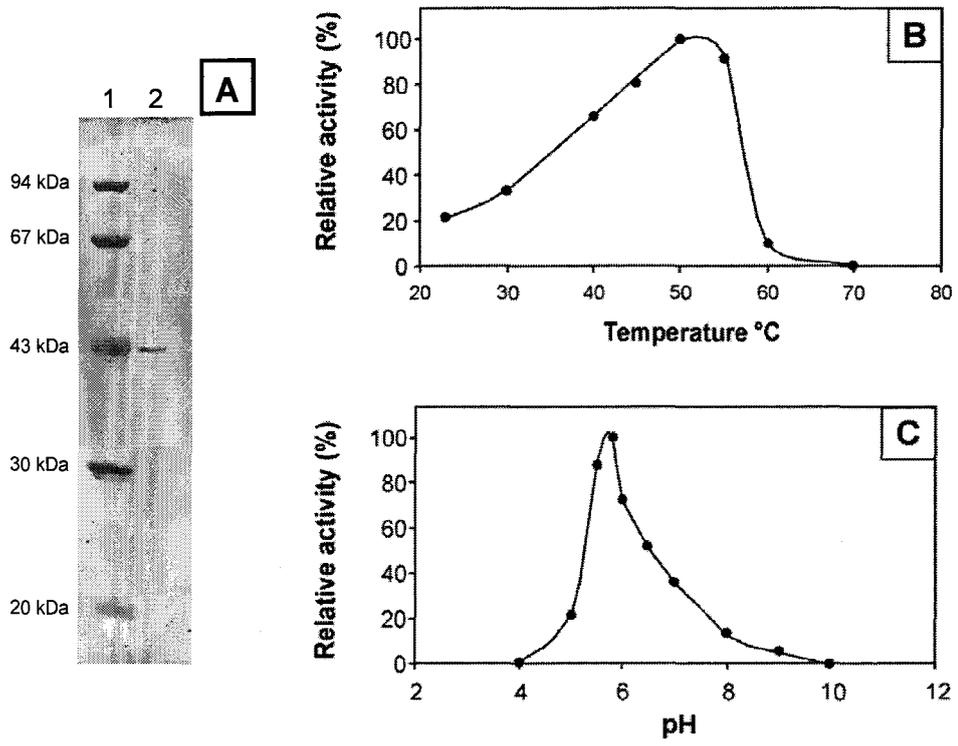
5

1 Figure 1



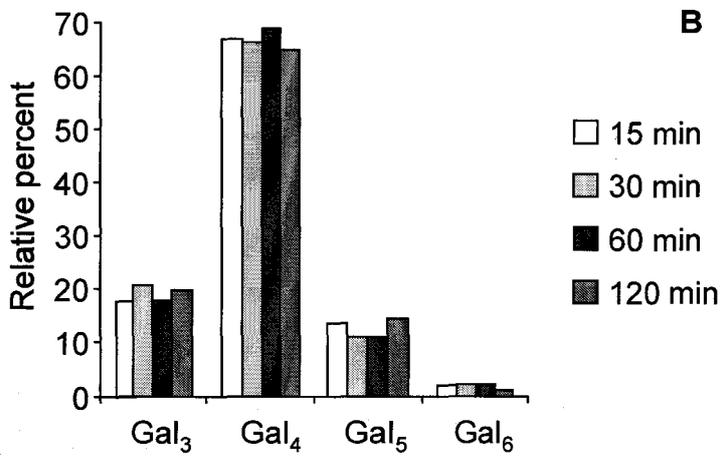
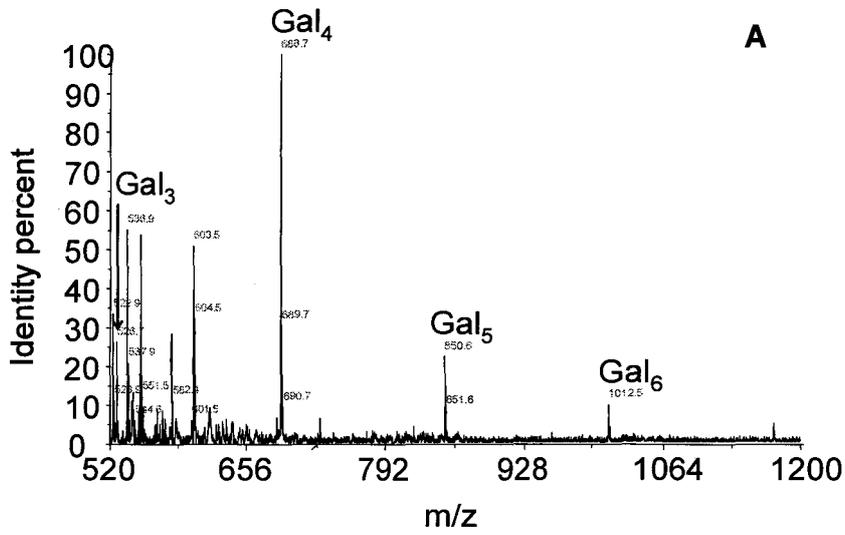
2

1 Figure 2



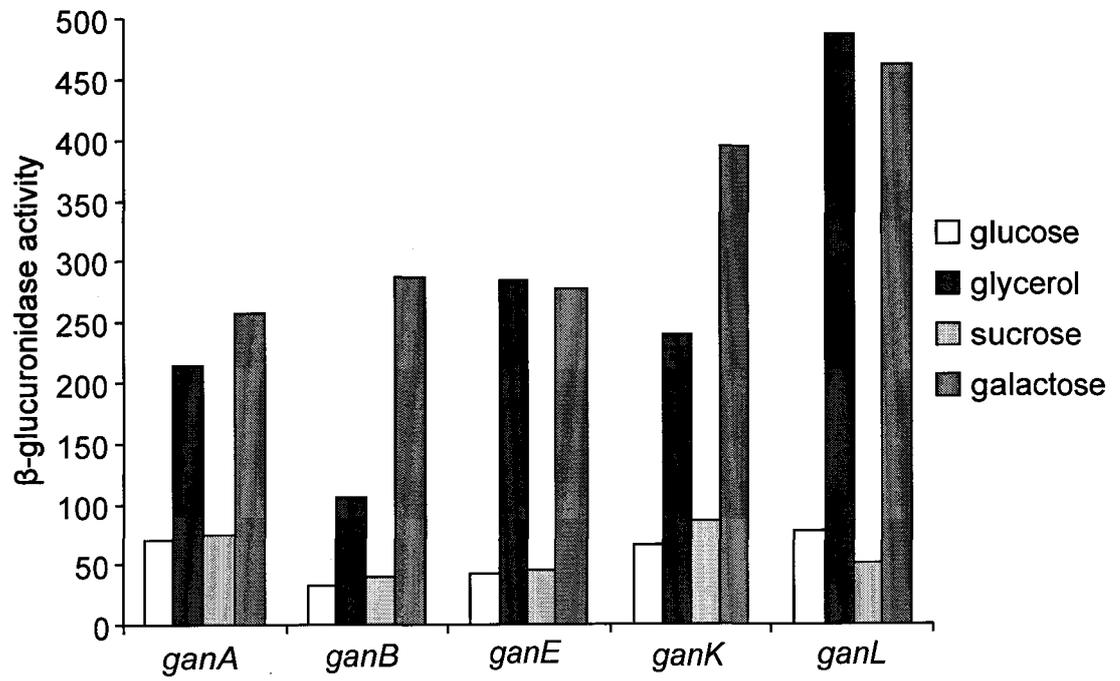
2

1 Figure 3



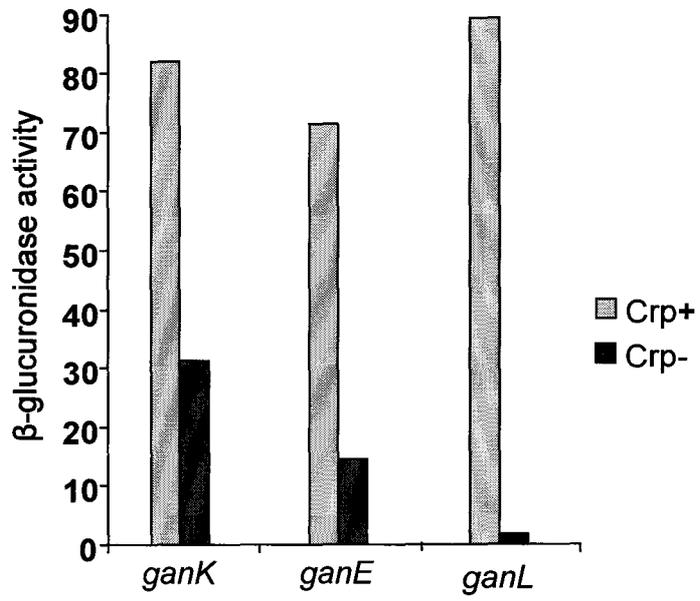
2

1 Figure 4



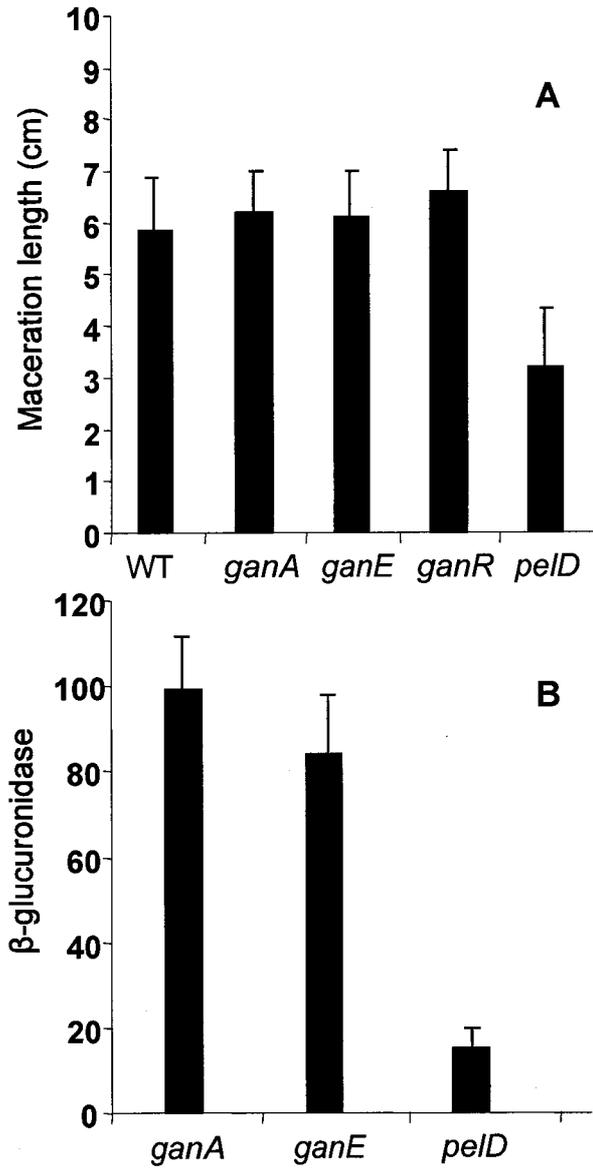
2
3

1 Figure 5



2
3

1 Figure 6



2

Linear Osmoregulated Periplasmic Glucans Are Encoded by the *opgGH* Locus of
Pseudomonas aeruginosa

Running Title: Osmoregulated Periplasmic Glucans in *Pseudomonas aeruginosa*

5

Content category : Biochemistry and Molecular biology

Yannick Lequette^{1*}, Eglantine Rollet², Aurélie Delangle²,
E. Peter Greenberg¹ and Jean-Pierre Bohin²

10

¹Department of Microbiology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA and

²Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle CNRS UMR 8576, Université des
Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq Cedex, 59655, France.

15

* Corresponding author: Yannick Lequette

LGPTA, CERTIA

INRA

369 rue Guelde

20

Villeneuve d'Ascq, 59370, France

Phone: 33 320 434 443

Fax: 33 320 435 426

Email: yannick.lequette@lille.inra.fr

ABSTRACT

Osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) are produced by many *Proteobacteria*. The OPGs are important for bacterial-host interactions. The *opgG* and *H* genes are involved in synthesis of OPGs. The *Pseudomonas aeruginosa* genome possesses two ORFs, PA5077 and PA5078 that show similarity to *opgH* and *opgG* genes of *P. syringae*, respectively. We report that the *opgGH* locus of *P. aeruginosa* PA14 is involved in the synthesis of linear polymers with β -1,2 linked-glucosyl residues branched with few β -1,6 glucosyl residues. Succinyl residues also substitute this glucose backbone. Transcription of *opgGH* is repressed by high osmolarity. Low osmolarity condition promotes formation of highly structured biofilm while biofilm development is slower and biomass is reduced in high osmolarity condition. Biofilm development of an *opgGH* mutant grown in low osmolarity condition presents a similar phenotype of wild type biofilm grown in high osmolarity condition. These results suggest OPGs are one important factor for biofilm formation in low osmolarity condition. However, *opgGH* do not appear to be involved in resistance of *P. aeruginosa* PA14 biofilms to antibiotics as has been suggested to be the case for *ndvB* gene.

INTRODUCTION

The osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) occur in a wide variety of gram-negative bacterial species. The only sugars found in the backbone of OPGs are glucosyl residues, which are essentially bound with β -glucosidic linkages. Generally, OPG synthesis is activated by conditions of low osmolarity (Bohin & Lacroix, 2006). The OPGs vary from 5 to 25 glucosyl residues per molecule. Glucose backbones of OPGs show a structural diversity throughout species. There are four families of OPGs: family 1 consists of heterogeneous-sized OPGs with a linear backbone of β -1,2 linked glucosyl residues to which branches of glucosyl units are linked by β -1,6 bonds (Bohin & Lacroix, 2006). Family II consists of heterogeneous-sized OPGs with cyclic β -1,2-glucan backbones. Family III consists of homogeneous-sized OPGs with a cyclic backbone containing glucosyl residues linked by β -1,3, β -1,6 bonds and sometimes by β -1,4 bonds. Family IV members consist of homogenous-sized OPGs with cyclic β -1,2-glucan backbones and one α -1,6 bond. Additionally, substituents derived from membrane phospholipids (phosphoglycerol, phosphoethanolamine, phosphocholine residues) or from intermediary metabolism (succinate, acetate residues) can decorate the backbones independent of backbone structure (Bohin & Lacroix, 2006).

Studies of OPGs synthesis in different species have revealed three distinct glycosyl transferases involved in the biosynthesis of the glucosyl backbone. Genomic sequencing suggests the *opgH*-encoded glycosyl transferase is the most common among the three. The OpgH protein was initially named MdoH (Membrane-derived oligosaccharides) (Lacroix *et al.*, 1991) in *Escherichia coli* and HrpM (Hypersensitive reaction and pathogenicity) in *Pseudomonas syringae* (Mukhopadhyay *et al.*, 1988). OpgH homologs, which show a typical glycosyl transferase 2 domain, can catalyze the synthesis of linear OPGs of Family I (like in *P. syringae*, (Talaga *et al.*, 1994)) or cyclic OPGs of Family IV in *Rhodobacter sphaeroides* (Talaga *et al.*, 2002). The *opgH* gene is the second gene of the *opgGH* operon. The periplasmic protein

OpgG is necessary for OPGs biosynthesis. Its function remains unclear. Hypothesis suggests OpgG may be involved in formation of β ,1-6 linkages and/or in periplasmic release of newly synthesized OPGs. Synthesis of Family II and III OPGs is dependent on proteins named NdvB in *Sinorhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum*. However, the two NdvB polypeptides
5 do not show significant sequence similarity.

The importance of OPGs in pathogenesis has been shown for many human, animal or plant pathogens (Bohin & Lacroix, 2006). Mutants defective in OPGs biosynthesis display pleiotropic phenotypes often including hyperproduction of exopolysaccharides, motility defects, and hypersensitivity to antibiotics. An explanation of the pleiotropy is that OPGs are critical for
10 normal organization of the cell envelope.

The opportunistic pathogen *P. aeruginosa* can be found free living in water and soil (Hardalo & Edberg, 1997). This bacterium also causes infections in a variety of animals and plants and can cause acute infections or chronic biofilm infections in lungs of cystic fibrosis patients (Burns *et al.*, 1993; Costerton, 1995; Costerton *et al.*, 1999; Hoiby, 1993; Singh *et al.*, 2000; Smith & Iglewski, 2003). A recent report demonstrated that the *P. aeruginosa* gene PA1163 plays a role
15 in the tolerance of biofilm cells to antibiotics (Mah *et al.*, 2003). The protein encoded by PA1163 shows 58% identity to the NdvB in *B. japonicum*. The identity of the compound synthesized by NdvB in *P. aeruginosa* has not been determined. Two other *P. aeruginosa* genes, PA5077 and PA5078 encode putative polypeptides showing sequence similarity with OpgH and OpgG,
20 respectively. The polypeptide encoded by PA5077 in *P. aeruginosa* shows 74% and 76% of similarity with the OpgH polypeptides of *P. syringae* and *E. coli*, respectively. The polypeptide encoded by PA5078 ORF shows 82% and 81% of similarity with the OpgG polypeptides of *P. syringae* and *E. coli*, respectively. An *opgH* mutant (PA5077) of *P. aeruginosa* PA14, obtained by screening a random transposon insertion library showed impaired in virulence in
25 *Caenorhabditis elegans*, mouse and *Arabidopsis* virulence models (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999).

Here, we report that PA5077 and PA5078 in *P. aeruginosa* PA14 are responsible for the synthesis of OPGs similar to those present in a variety of bacterial species (Bohin & Lacroix, 2006). The glucans are linear with β -1,2 linked glucose units branched by β -1,6 glucose units. Succinyl residues substitute the glucose backbone. We also show that *opgGH* and *ndvB* do not cooperate in the biosynthesis of these linear OPGs. Although strains with *opgG* and *H* defects form abnormal biofilms the linear glucans do not appear to participate in the tolerance of biofilm cells to antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. The parent strain was *P. aeruginosa* PA14. Strain YL119 contained a PA5077 and PA5078 deletion and was constructed as follows: The intermediate construct pYL177 was generated by flanking a gentamicin resistance cassette with a 1.58-kb DNA fragment containing the region upstream of the PA5078 start codon and a 1.89-kb DNA fragment containing the region downstream of the PA5077 stop codon. A KpnI fragment containing the mobilization cassette from pKV69 was inserted into the KpnI restriction site of pYL177 to create pYL178, a mobilizable suicide vector. We moved pYL178 from *E. coli* SM10 into *P. aeruginosa* PA14 by conjugation. To obtain *P. aeruginosa* YL119 we selected gentamicin resistant colonies and then screened for carbenicillin sensitivity. Strain YL119 has a deletion encompassing the entire operon PA5078-PA5077, from 250 bp upstream of the PA5078 start codon and 171 bp downstream of the PA5077 stop codon. The deletion was confirmed by PCR analysis. A DNA fragment containing 1.58 kb upstream of the PA5078 start codon, the two ORFs PA5078 and PA5077 and 171 bp downstream of the PA5077 stop codon was cloned into pUCP18 to generate pYL205.

We used LB broth and Low-Osmolarity medium (LOS) to grow *P. aeruginosa* and *E. coli*. The LOS medium contains K_2HPO_4 (1mM), $(NH_4)_2SO_4$ (1.5 mM), $MgCl_2$ (0.08mM), casein hydrolysate (4g/l), trace metals (1ml/l) and glucose (0.3 mM) (Heydorn *et al.*, 2000). The osmolarity of the LOS medium was increased by addition of sucrose or NaCl where indicated.

Antibiotics were used as appropriate at the following concentrations (per ml): carbenicillin, 150 µg, gentamicin, 100 µg, for *P. aeruginosa* or ampicillin, 50 µg, gentamicin, 10 µg for *E. coli*.

Real-time PCR. The following primers were designed with Primer Express software (Taqman) and used for real-time PCR analyses: 5'-CGTTACACCCCGGTCCTGAA-3', and 5'-ACCGGCTTCTTCGGATCCT-3' for PA5078, and 5'-ATCCAGTGGCTGATCGAACAG-3' and 5'-CGGGTCAGGTGGTATTCGAA-3' for *nadB*. Total RNA was extracted from cultures when they reached an optical density (600 nm) of 0.8. RNA was purified with RNAeasy kit (Qiagen) and cDNA was synthesized as described previously (Schuster *et al.*, 2003). PCR controls using designated primers were performed with cDNA or genomic DNA to verify integrity of PCR products. Real-time PCR reactions included 5 ng of cDNA, and primers at a concentration of 300 nM in 25 µl of SYBR Green PCR amplification Master Mix (Applied Biosystems). Real-time PCR was 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C (denaturation), and 1 min at 60°C (annealing and extension). Genomic DNA was used as a standard, and *nadB* (PA0761) was used as an internal control. No amplification was measured when RNA was added. Real-time PCR reactions were performed on ABI 7900HT apparatus and associated software SDS 2.1 was used to assess cDNA levels.

Biofilm experiments in flow chambers. Biofilms were grown in flow chambers as described elsewhere (Davies *et al.*, 1998). We used the LOS medium for flow chamber experiments. Overnight cultures were used to inoculate chambers with 5×10^6 bacteria in 500 µl of LOS medium. One hour after inoculation of the chambers, flow was initiated at a rate of 0.17 ml per min. Acquisition of biofilm images was with a Zeiss scanning confocal laser microscope (SCLM) system (Axioplan2 confocal microscope and Laser scanning module LSM 5.10 from Carl Zeiss MicroImaging, Inc, NY). The excitation wavelength for the Green Fluorescent Protein (GFP) was 488 nm and emission wavelength was collected over 505 nm with a LP 505 filter. Three distinct objective lenses were used: A plan-apochromat x63 oil objective lens, a C-

apochromat x40 water objective lens, and a plan-neofluar x20 objective lens. Three-dimensional images were generated with Volocity software (Improvision, Lexington, MA). All biofilm experiments were repeated a minimum of 4 times at room temperature (26-28 C). Measurements of biofilm architectural features were determined by using COMSTAT v.1
5 software (Heydom *et al.*, 2000).

Isolation and purification of OPGs. *P. aeruginosa* strains were grown overnight in 350 ml LOS medium. Cells were harvested by centrifugation. The OPGs were extracted from cell pellets with 5% trichloroacetic acid followed by charcoal adsorption and elution with aqueous pyridine as previously described . OPGs present in the aqueous pyridine extracts were purified
10 by gel-filtration chromatography on a Bio-Rad Biogel P6 column (1.8 cm by 62 cm, flow rate of 10 ml per h). The column was pre-equilibrated with 0.05% acetate solution and OPGs were eluted with 0.05% acetate solution in fractions of 1 ml. Sugar content was determined by colorimetric procedure using phenol-sulfuric acid reagent (Dubois, 1956). Fractions containing sugar were pooled and concentrated by rotary evaporation. Where indicated, fractions of OPGs
15 were treated with 0.05 M KOH at 37 °C for 1 h to remove O-ester-bound substituents. After neutralization with AG 50W-X8 (Bio-Rad, H⁺ form) samples were desalted on Bio-Gel P2 column. Native and KOH treated oligosaccharides were lyophilized.

Mass spectrometry. Matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI)-mass spectrometry (MS) experiments were done with a Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen,
20 Germany) time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337-nm wavelength and 3-ns pulse width). A 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix was used for carbohydrate analysis (10 g/liter in water) (Stahl *et al.*). Lyophilized oligosaccharides samples were dissolved in double-distilled water at a concentration of 0.1 µg per µl and then diluted with an appropriate volume of the matrix solution (1:2, vol/vol). One µl of the resulting solution was deposited on a
25 stainless steel target, and the solvent was evaporated under a gentle stream of warm air. After microscope-assisted selection of the appropriate site on the target, laser light was focused onto

the sample-matrix mixture at an angle of 15° and a power level of 106 to 107 W/cm². Positive ions were extracted by a 5- to 10-keV acceleration potential and focused with a lens. Masses were separated by a Reflectron time-of-flight instrument. Ions were postaccelerated to 20 keV for maximum detection efficiency at the detector. Resulting signals were recorded by using a fast transient digitizer with a maximum of 2.5 ns channel resolution. All MALDI mass spectra are the result of 20 single-shot accumulations.

Methylation analysis. Oligosaccharides were treated with sodium borodeuteride to reduce the reducing glycosyl termination. Glucosidic linkage analysis was performed by the methylation method of Paz Parente *et al* (Paz Parente *et al.*, 1984). Methyl ether compounds were hydrolyzed (trifluoroacetic acid 4 N at 100°C for 4 h), reduced with sodium borodeuteride and peracetylated. The partially methylated and acetylated glycosides were analyzed by gas-liquid chromatography and mass spectrometry GLC-MS using a Delsi apparatus with a capillary column (25 m by 0.2 mm) coated with DB-1 (0.5- μ m film thickness). We applied a temperature gradient of 110°C to 240°C at 2°C per min and a helium pressure of 40 kPa. Mass spectra were recorded on a Nermag 10-10B mass spectrometer (Rueil Malmaison, France) using electron energy of 70 eV and ionizing current of 0.2 mA. Specific Standards of glucosyl residues were used to calibrate the GLC column and identify the eluted glycosides. Identity of each eluted glycosides was confirmed by MS coupled to GLC (Fournet *et al.*, 1981).

RESULTS

The *opgGH* locus is required for synthesis of linear periplasmic glucans. The *opgGH* gene products are involved in synthesis of cyclic or linear OPGs in bacteria (Bohin & Lacroix, 2006). To determine the function of OpgH (PA5077) and OpgG (PA5078) in *P. aeruginosa*, we generated *P. aeruginosa* YL119, a derivative of strain PA14 with a deletion of the *opgGH* locus. Extracts from the parent strain PA14 and YL119 were separated by gel filtration. A large peak containing sugar residues was eluted in fractions 80 to 100 from PA14 extracts (Fig. 1). This peak was absent in extracts from the *opgGH* mutant strain YL119. For each strain, fractions 80

to 100 were pooled for further analyses. Mass spectrometry of the pooled fractions from PA14 extracts revealed the presence of 8 molecular ions (Fig. 2). Five molecular ions, $m/z = 1013$, $m/z = 1175$, $m/z = 1337$, $m/z = 1499$ and $m/z = 1661$ correspond to five distinct linear polymers containing 6 to 10 glucose residues, respectively. Three molecular ions with $m/z = 1275$, $m/z = 1437$ and $m/z = 1599$ correspond to linear polymers of 7, 8 and 9 glucosyl residues respectively with a mass increment of 100 each (Fig. 2). A mild alkaline treatment of OPGs eliminates the substituent responsible of this increment. The mass increment of 100 may correspond to a succinate residue or an isomer. Mass spectrometry of the pooled fractions 80 to 100 from strain YL119 did not reveal any polymers of glucose (data not shown). To confirm that the *opgGH* locus is necessary for the biosynthesis of OPGs, we complemented the *opgGH* mutation in strain YL119 with pYL205, which contains *opgGH* and 1.58 bp upstream of the *opgG* translation start codon. Strain YL119 (pYL205) produced 14 times more OPGs than wild-type PA14 (27×10^{-15} g and 2×10^{-15} g of equivalent glucosyl residues per cell, respectively, taking in account only the second peak in Fig. 1).

The OPGs were desubstituted with mild alkaline treatment for further structural characterizations. After reduction, methanolysis, and peracetylation (See Materials and Methods) products were analyzed with GLC-MS to determine the types of glucosyl linkages. The analysis revealed four methylglucose species: 3,4-di-, 3,4,6-tri-, 2,3,4,6-tetra-, 1,3,4,6-tetra-O-methylglucoses with respective proportions of 12%, 40%, 34% and 14%. According to these proportions, an average OPG molecule containing 7 glucosyl units is formed of one 1,2,6-linked glucosyl residue (3,4-di-O-methylglucose, point of branch), three 1,2-linked glucosyl residues (3,4,6-tri-O-methylglucose), two 1-linked glucosyl residues (2,3,4,6-tetra-O-methylglucose, non-reducing termination) and one 2-linked glucosyl residue (1,3,4,6-tetra-O-methylglucose, reducing termination). The glucose backbones of OPGs from the complemented mutant YL119 were indistinguishable from the parent OPGs.

In other bacteria the expression of *opgGH* homologs is generally repressed by high environmental osmolarity (Bohin & Lacroix, 2006). To determine if this is true of *opgGH* in *P. aeruginosa* we measured *opgGH* transcript levels by real-time PCR in *P. aeruginosa* PA14 grown in LOS medium (low osmolarity medium, 70 mOsm) and LOS medium supplemented with 300 mM of sucrose or 150 mM of NaCl (370 mOsm). In LOS medium expression of *opgGH* was at least four times higher than in LOS medium added with sucrose or NaCl. In LOS medium *opgGH* RNA quantity reached 54 ± 10 fg of *opgGH* RNA per ng of RNA, while in LOS medium with added sucrose or NaCl *opgGH* RNA quantities were only respectively 13 ± 2 and 10 ± 3 fg of *opgGH* RNA per ng of RNA. These results confirm OPGs biosynthesis in *P. aeruginosa* is repressed in high osmolarity conditions.

Involvement of the linear OPGs in biofilm formation. A previous report indicated that cyclic periplasmic glucans were critical for tolerance of *P. aeruginosa* biofilm cells to antibiotics (Mah *et al.*, 2003). To determine whether the *opgGH*-dependent linear OPGs influenced biofilm formation or biofilm tolerance to antibiotics we first measured biofilm formation in LOS medium by using a microtiter dish assay (O'Toole & Kolter, 1998) and we detected no significant difference in the amount of biofilm formed by the mutant *opgGH* and the parent using LOS medium with or without added NaCl 150 mM or sucrose 300 mM or M63 medium (data not shown). We then measured biofilm sensitivity to tobramycin using the microtiter dish assay described by Mah *et al.* (Mah *et al.*, 2003). We also detected no difference in sensitivity of the *opgGH* mutant and the parent to tobramycin. The minimal bactericidal concentration (MBC) was 400 μ g per ml for either strain. As a control we tested the mutant *ndvB* described by Mah *et al.* (O'Toole & Kolter, 1998) as sensitive to tobramycin during biofilm growth. This mutant showed a reduced MBC in the biofilm mode of growth (50-100 μ g per ml) but was unaffected in planktonic growth (MBC for all three strains was 4-8 μ g per ml). Thus we do not believe the linear OPGs play an important role in attachment of cells to a substratum or biofilm resistance to tobramycin.

All of the previously described biofilm experiments involve early biofilm development in static growth conditions. Thus we decided to study the influence of *opgGH* on biofilm development under a flow of culture medium by using scanning confocal microscopy (Fig. 3). Twenty-four hours after inoculation with the parent PA14, individual cells and some small cell clusters were evident on the glass surface of the flow cell. A similar pattern was observed with the *opgGH* mutant at 24 h. At 48 h, microcolonies of the parent had developed. With the mutant bacterial cells remained as individuals at 48 h. At 72 h, microcolonies of the parent were larger than those observed at 48 h with an average thickness of 25 μm and a maximum thickness of 65 μm (Table 2). The biofilm covered the entire glass surface. During the next four days, the biofilm formed the mushroom-like structures characteristic of mature *P. aeruginosa* biofilms grown under the conditions we used (Fig. 3). With the mutant, microcolonies did not appear at 48 h but they were evident at 72 h. However, the mutant biofilm did not develop further during the next four following days (Fig. 3). A statistical analysis with COMSTAT v.1 (Heydorn *et al.*, 2000) confirmed our qualitative analysis (Table 2). For example, the average thickness of a 5-days mutant biofilm was 25% of the parent, and the total biomass was about half that of the parent. The mutation did not affect growth of *P. aeruginosa* in either LB broth or LOS medium (data not shown).

To confirm that the biofilm defect in the mutant YL119 was a result of the *opgGH* defect we transformed YL119 with the plasmid pYL205-G, which carries a copy of *opgGH* locus and a constitutively expressed *gfp* gene. Then, we studied biofilm development in the complemented strain. Biofilms were similar to parent biofilms (Table 2 and supplemental figure 1). Apparently, there is a subtle involvement of *opgGH* in biofilm development. The mutant is slow to develop microcolonies and does not develop into mature biofilms with mushroom-like structures. Then, we studied biofilm formation of wild type PA14 and the *opgGH* mutant in high osmolarity condition by adding sucrose (300 mM) or NaCl (150 mM) to the LOS medium. Both wild type

PA14 and the *opgGH* mutant biofilms showed the same phenotype as biofilm of the YL119 mutant grown in low osmolarity condition (Table 2 and Figure 3).

Motility and rhamnolipids production are not affected by *opgGH*. Motility mediated by type IV pili and the polar monotrichous flagellum, respectively (Harshey, 2003), and rhamnolipids are known to be involved in microcolony and mushroom-like structure development (Davey *et al.*, 2003; Klausen *et al.*, 2003a; Klausen *et al.*, 2003b; Lequette & Greenberg, 2005). To determine whether abnormal biofilm development in the *opgGH* mutant resulted from altered motility, we compared flagellar and twitching motility of the mutant to the parent. We used LOS medium as base medium with 0.3%, 0.5% and 1% agar, respectively for swimming, swarming and twitching motility measurements (Bradley, 1980; Kohler *et al.*, 2000; Taylor & Koshland, 1974). The mutant and parent were indistinguishable (data not shown). We monitored rhamnolipid gene expression by using a *rhlA-gfp* fusion and rhamnolipid production by a rhamnolipid plate assay (Kohler *et al.*, 2000; Lequette & Greenberg, 2005). As with motility, we could not distinguish the parent and mutant (data not shown).

15 DISCUSSION

A previous screen for virulence mutations in *P. aeruginosa* indicated that *opgH* is involved in pathogenesis. Similarly, an *opgH* mutant of the plant pathogen *P. syringae* *opgH* was shown to be nonpathogenic (Mukhopadhyay *et al.*, 1988). Genomic sequencing has shown that *opgH* is often immediately downstream of *opgG* in a putative operon (Bohin & Lacroix, 2006). In *P. aeruginosa* there are adjacent *opgG* (PA5078) *opgH* homologs (PA5077) that show a three-codon overlap, and are likely co-transcribed as an *opgGH* operon.

We show that in *P. aeruginosa* *opgGH* is involved in the biosynthesis of a linear glucans with heterogeneous size ranging from 6 to 10 glucosyl units per molecule. Expression of *opgGH* is repressed by elevating the osmolarity of the culture medium. Our analysis of *opgGH*-dependent glucans revealed that the glucosyl backbone is a linear chain of glucosyl units linked in position 1 and 2, and branched with few glucosyl residues linked in position 6. All *OpgH*

homologs share motifs conserved in glycosyl transferases of Family 2 that catalyze glycosyl linkages with a β anomery (Coutinho *et al.*, 2003) (Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). OpgH homologs catalyze the formation of β -1,2 linkages using UDP- α -glucose as a substrate (Loubens *et al.*, 1993; Therisod *et al.*, 1986). One can assume that like other OpgHs, the *P. aeruginosa* OpgH catalyzes the synthesis of a β -1,2 linked linear glucose chain by using UDP- α -glucose as well. Unlike OPGs in *P. syringae*, our analysis indicates the glucosyl backbones of *P. aeruginosa* OPGs are substituted, probably with succinate residues. We do not know what physiological significance such decoration might confer. Periplasmic glucans synthesized by the *P. aeruginosa* OpgG and H can represent 0.75% of the dry cell weight in our parent strain PA14. Moreover, in the *opgGH* overexpression strain the OPGs constituted nearly 10% of the total cell dry weight. OPG synthesis was not affected by inactivation of *ndvB* and no cyclic glucans could be extracted by 5% trichloroacetic acid method (data not shown), a procedure known to allow purification of cyclic OPGs (Talaga *et al.*, 2002).

We investigated the involvement of *opgGH* in biofilm development because a previous report suggested periplasmic glucans might be involved in the innate tolerance of cells in *P. aeruginosa* biofilms to antibiotics (Mah *et al.*, 2003). The previous work involved a genetic screen for mutations that increased the sensitivity of biofilms to the clinically relevant antibiotic tobramycin. The screen revealed that mutations in *ndvB* decreased biofilm resistance to tobramycin. Using an assay similar to that used previously we showed that unlike *ndvB*, the *opgGH* locus was not involved in tolerance to tobramycin, even though the OPGs synthesized by OpgGH were significant in quantity. This line of investigation led us to explore the potential relationship between *opgGH* and biofilm development more thoroughly. Our experiments indicate that initiation of biofilm development is not altered by an *opgGH* mutation, but there is a delay in development of microcolonies which did not develop into the normal mushroom-like

structures characterizing wild-type biofilms in low osmolarity conditions. Increasing the medium osmolarity affected also biofilm growth rate and development of mushroom-like structure of wild-type PA14 (Table 2). These results suggest that *P. aeruginosa* PA14 develops preferentially larger and structured biofilms in low osmolarity conditions, and OPGs are one important factor
5 for biofilm development in these conditions.

In summary, previous investigations showed that *opgH* is involved in virulence of *P. aeruginosa*. We show here that like in other bacteria the *P. aeruginosa* *opgGH* operon is required for synthesis of abundant osmotically regulated glucans, which we assume periplasmic. We have characterized the structures of these glucans but how they function in
10 virulence remains to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Yves Leroy for expert technical assistance for GLC-MS analyses, Sudha Chugani for helpful discussion, and G. O'Toole for providing SMC1759 strain. This work was supported by grants from the W. M. Keck Foundation, the US National Institute of General Medical
15 Sciences (GM59026), the French Centre National de Recherche Scientifique (UMR 8576), and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie.

CITED LITERATURE

- Bohin, J. P. & Lacroix, J. M. (2006).** Osmoregulation in the Periplasm. *In M Ehrmann (ed) The Periplasm, ASM Press , Washington, DC, 325-341.*
- 5
- Bradley, D. E. (1980).** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**, 146-154.
- Burns, J. L., Ramsey, B. W. & Smith, A. L. (1993).** Clinical manifestations and treatment of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Adv Pediatr Infect Dis* **8**, 53-66.
- 10
- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**, 137-140.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- 15
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. & Henrissat, B. (2003).** An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**, 307-317.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 1027-1036.
- 20
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- 25

de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386-405.

- 5 **Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Biochem* **28**, 350-356.

Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981). Gas-liquid chromatography and mass-spectrometry of methylated and acetylated methylglycosides: application to the structural
10 analysis of glycoprotein glycans. *Anal Biochem* **116**, 489-502.

Hardalo, C. & Edberg, S. C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* **23**, 47-75.

- 15 **Harshey, R. M. (2003).** Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249-273.

Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K. & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT.
20 *Microbiology* **146**, 2395-2407.

Hoiby, N. (1993). Cystic fibrosis and endobronchial *Pseudomonas* infection. *Curr Opin Pediatr* **5**, 247-254.

- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003a).** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**, 61-68.
- 5 **Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003b).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J. C. (2000).** Swarming of
10 *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Lacroix, J.-M., Loubens, I., Tempête, M., Menichi, B. & Bohin, J.-P. (1991).** The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol Microbiol* **5**, 1754-1753.
15
- Lequette, Y. & Greenberg, E. P. (2005).** Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**, 37-44.
- Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J.-M. & Bohin, J.-P. (1993).** Homology
20 between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **10**, 329-340.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. & O'Toole, G. A. (2003).** A
25 genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**, 306-310.

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

5 **Mukhopadhyay, P., Williams, J. & Mills, D. (1988).** Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **170**, 5479-5488.

O'Toole, G. & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a generic analysis. *Mol*
10 *Microbiol* **28**, 449-461.

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

15

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

Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and
20 signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066-2079.

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

25

Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762-764.

5 **Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003).** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.

Stahl, B., Steup, M., Karas, M. & Hillenkamp, F. (1991). Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **63**, 1463-1466.

10

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

Talaga, P., Cogez, V., Wieruszkeski, J. M., Sthal, B., Lemoine, J., Lippens, G. & Bohin, J. P. (2002). Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **269**, 2464-2472.

15

Taylor, B. L. & Koshland, D. E., Jr. (1974). Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction. *J Bacteriol* **119**, 640-642.

20

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*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 7236-7240.

25 **Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989).** Quantitative evaluation of

Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Wild type	(Rahme & <i>al</i> , 2000)
YL119	Gm ^r , Δ <i>opgGH::gm^r</i> .	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F' <i>lendA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> Φ 80 <i>dlacZ-M15 recA1</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
SM10	Km ^r , <i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu</i>	(de Lorenzo & Timmis, 1994)
Plasmids		
pUCP18	Cb ^r , pUCP18 vector containing a <i>P. aeruginosa</i> origin of replication.	(Schweizer, 1991)
pMRP9	pUCP18 with constitutive <i>gfp</i>	(Davies <i>et al.</i> , 1998)
pKV69	Cm ^r , Tet ^r . Vector carrying <i>mobRP4</i> origin.	K. Visick, Loyola univ. of Chicago
pYL177	Amp ^r , gentamicin cassette flanked with 1.58 kb region upstream and 1.89 kb region downstream of <i>opgGH</i> locus.	This study
pYL178	Amp ^r , mobilization cassette from pKV69 cloned into KpnI restriction site of pYL177.	This study
pYL205	Plasmid containing <i>opgGH</i> locus.	This study
pYL205-G	pYL205 containing a constitutively expressed <i>gfp</i> gene	This study

Cm^r, chloramphenicol resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Tet^r, tetracycline resistance, Gm^r, gentamicin resistance, Cb^r, carbenicillin resistance.

Table 2. Quantitative analyses of biofilm structures.

Strain	Total biomass ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Average thickness (μm)	Roughness coefficient	Surface area of biomass (μm^2) $\times 10^6$	Surface to biovolume ratio ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$)	Maximum thickness (μm)
<i>LOS medium</i>						
PA14	41 \pm 16	70 \pm 34	0.59 \pm 0.20	4.42 \pm 0.28	1.99 \pm 0.70	133 \pm 26
YL119	21 \pm 9	25 \pm 10	0.42 \pm 0.10	1.21 \pm 0.67	1.17 \pm 0.65	62 \pm 14
PA14 day 3	21 \pm 8	24 \pm 9	0.54 \pm 0.29	1.19 \pm 0.33	1.21 \pm 0.49	65 \pm 11
YL119 pYL205-G	37 \pm 7	51 \pm 11	0.51 \pm 0.10	3.67 \pm 1.53	2.08 \pm 0.71	148 \pm 29
<i>LOS medium with added sucrose (300 mM)</i>						
PA14	15 \pm 3	16 \pm 4	0.47 \pm 0.17	0.62 \pm 0.17	0.85 \pm 0.16	51 \pm 8
YL119	15 \pm 3	15 \pm 4	0.49 \pm 0.07	0.70 \pm 0.18	0.91 \pm 0.30	58 \pm 9
<i>LOS medium with added NaCl (150 mM)</i>						
PA14	11 \pm 2	12 \pm 3	0.52 \pm 0.10	0.59 \pm 0.10	1.0 \pm 0.21	48 \pm 7
YL119	9 \pm 3	9 \pm 3	0.49 \pm 0.14	0.61 \pm 0.08	1.1 \pm 0.31	45 \pm 6

The quantitative analysis of biofilm architecture was done using COMSTAT v.1. Results are the average of 10 representative images stacks. Standard deviations are in parentheses. Biofilm architectures of strains PA14 and YL119 with or without plasmid pYL205-G were measured at day 5 from different medium as indicated. Biofilm architecture of strain PA14 was also quantified at day 3 where indicated.

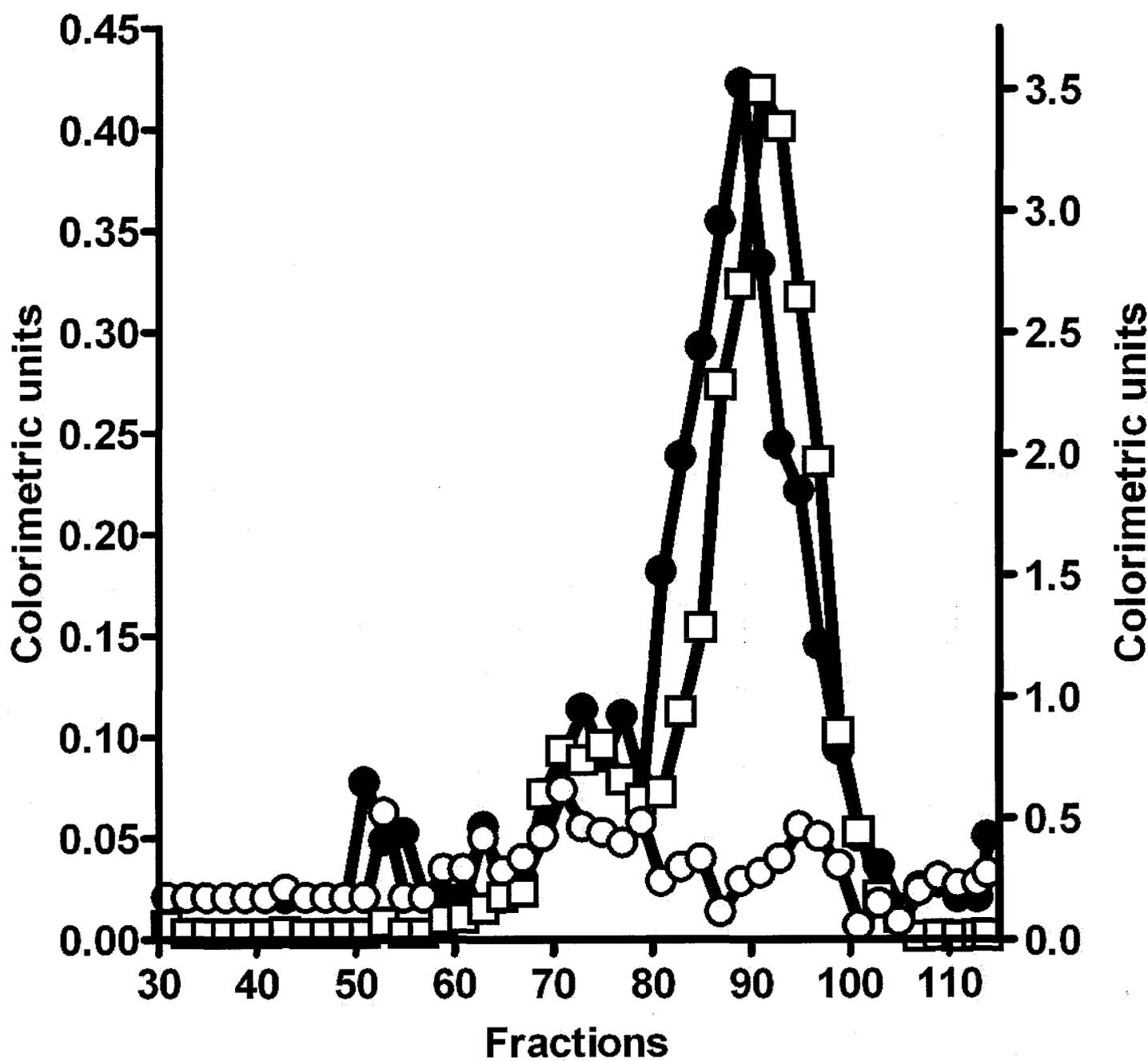
5

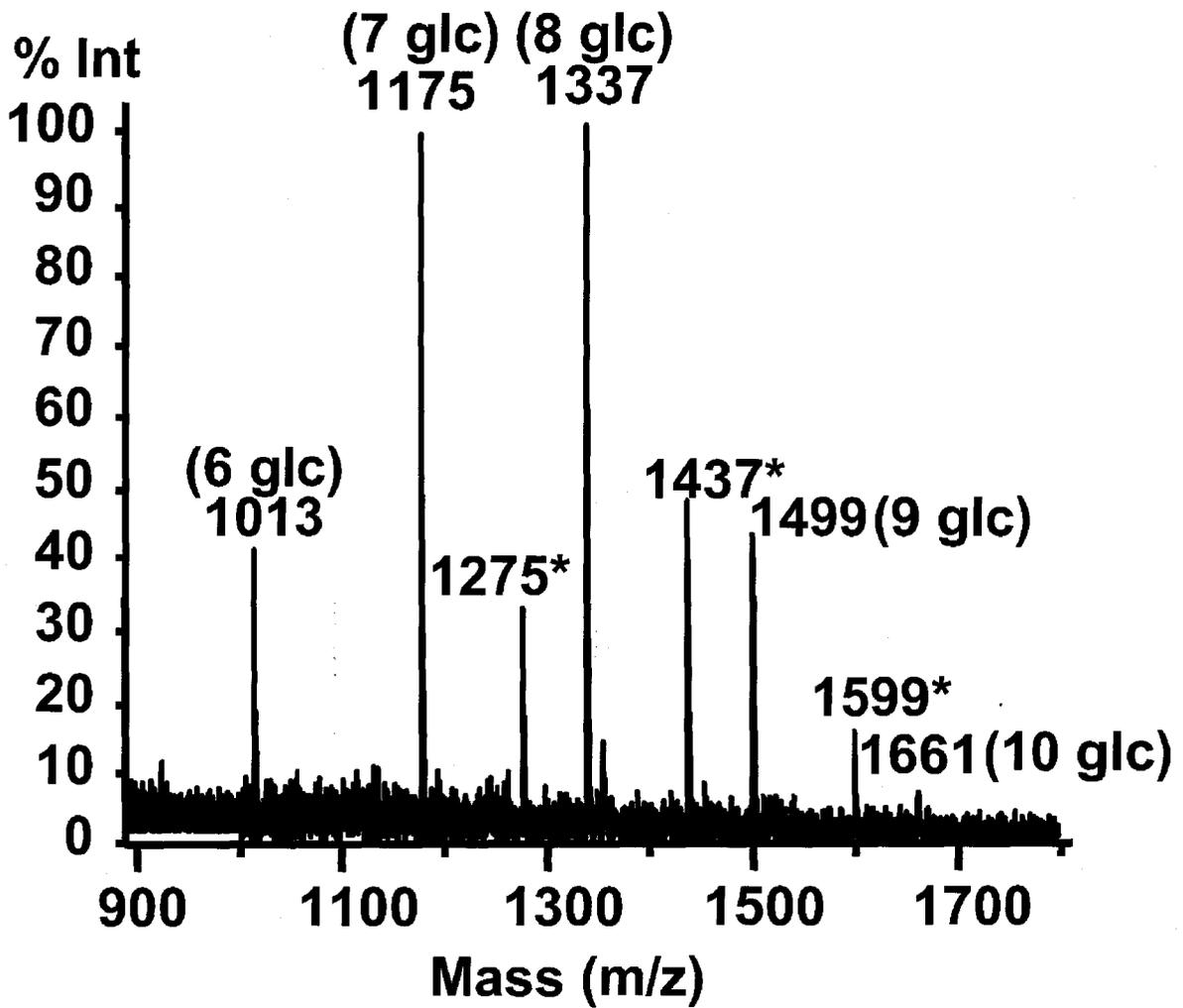
FIGURE LEGENDS

Figure 1. Purification of periplasmic glucans from *P. aeruginosa*. Extracts from the wild type PA14 (closed circle), the *opgGH* mutant strain YL119 (opened circle) and YL119 with plasmid pYL205 (opened square) were eluted on a gel-filtration Biogel P6 column (see Materials and Methods). PA14 and YL119 data are plotted on the left Y-axis and YL119-pYL205 data are plotted on the right Y-axis.

Figure 2. Positive ion mass spectrum of *P. aeruginosa* periplasmic glucans. Numbers over each peak are molecular weights of cationized species. Numbers in parentheses represent the degree of polymerization of the corresponding glucosyl polymer. Stars next to numbers indicate presence of a succinate residue in the glucosyl polymer.

Figure 3. Biofilm formation of the parent and the *opgGH* mutant in flow chamber. Biofilm development was followed over 7 days and images of 3D reconstruction of biofilms are shown for the wild type PA14 and the *opgGH* mutant (YL119) grown in LOS medium with or without added sucrose. Squares scales are indicated on pictures. The *gfp* gene was constitutively expressed from the self-maintained plasmid pMRP9.





LOS

LOS sucrose 300 mM

