



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'**Université Toulouse III – Paul Sabatier**

Discipline ou spécialité : **Biochimie**

---

Présentée et soutenue par **Emilie HUC**

Le **03 février 2011**

**O-mycoloylation :**  
**Caractérisation d'une nouvelle modification post-traductionnelle**  
**de petites protéines d'enveloppe chez les *Corynebacterineae***

---

### JURY

Dr Thierry Fontaine, Chargé de recherche , Institut Pasteur, Paris

Pr Pedro Luis Valero Guillen , Profesor Titular, Universidad de Murcia

Dr Jean-Marc Berjeaud, Maître de conférences, Université de Poitiers

Dr Christine Houssin, Maître de conférences, Université Paris-SudXI, Orsay

Pr Alain Milon, Professeur, Université Toulouse III

Dr Mamadou Daffé, Directeur de recherche, CNRS, Toulouse

Dr Marielle Tropis, Maître de conférences, Université Toulouse III

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Président

**Directeur d'équipe**

Directrice de thèse

---

Ecole doctorale : **Biologie-Santé-Biotechnologies**

Unité de recherche : **Institut de pharmacologie et de Biologie structurale CNRS UMR5089**

Directrice de Thèse : **Dr. Maryelle Tropis**



Ce travail a été effectué à l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (UMR5089 CNRS-Université Toulouse III), au sein de l'équipe « Enveloppes mycobactériennes : Structure, biosynthèse et fonctions » dirigée par le Dr Mamadou Daffé.

Tout d'abord, je remercie le Pr. Alain Milon qui m'a fait l'honneur de présider ce jury et l'ensemble des membres du jury : les rapporteurs, le Pr Pedro Luis Valero Guillen et le Dr Thierry Fontaine, les examinateurs les Dr Jean-Marc Berjeaud et Christine Houssin, pour leur disponibilité, l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour l'ensemble des discussions lors de la soutenance.

Mamadou, je vous remercie de m'avoir accepté dans votre équipe et permis de m'épanouir au cours de cette thèse passionnante. Un grand merci pour m'avoir transmis un peu de votre savoir et pour l'enthousiasme que vous avez toujours manifesté lors de nos discussions parfois dans des lieux plutôt inattendus comme l'aéroport de Francfort !

Marielle, je te remercie tout d'abord pour ton enseignement durant mes années d'études et tes conseils qui m'ont donné le goût de la biochimie structurale. Mes plus grands remerciements sont pour ces 4 années de thèse « magiques » qui, grâce à toi, m'ont fait de passer du stade d'étudiante à celui de chercheuse. J'ai apprécié la liberté que tu m'as laissée pour entreprendre de nouvelles approches tout en sachant me ramener sur des chemins plus balisés. Tes qualités humaines m'ont aidée à franchir certains moments difficiles avec sérénité et pour finir, je te remercie pour toute la confiance que tu m'as témoignée aussi bien du point de vue scientifique qu'humain.

Merci à toute l'équipe Daffé pour sa disponibilité, son soutien, les discussions enflammées scientifiques ou non, et bien sûr l'ambiance chaleureuse et familiale que j'ai eu la chance de partager pendant 4 ans. Je remercie aussi Rodika et Jean pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de leur stage.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble de l'équipe « Métabolisme des Corynébactéries » de l'université Paris Sud – Orsay en particulier Christine et Célia qui m'ont accueillie avec beaucoup d'enthousiasme et m'ont initiée à la biologie moléculaire de *C.glutamicum* avec succès et à la « vie parisienne » !

Merci à l'équipe du Pr. N. Bayan et en particulier à Xavier Méniche pour la collaboration fructueuse sur la mycoloylation.

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées lors de mes différents stages en particulier mes encadrants : Christelle et Jean-Marc, Marie et Valérie, et Luis qui m'ont fait découvrir l'univers de la recherche.

Je tiens à remercier particulièrement Fabien, petit major, grand ami, toujours présent dans les moments de doute pour me remotiver. Je te souhaite un grand avenir scientifique mais pas politique !

Enfin, je n'aurais jamais pu entreprendre cette thèse sans un soutien sans faille, dans les échecs comme dans les réussites de mes parents, Cédric et Ange ainsi que toute ma famille.



## **Abréviations**

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CEMOVIS : Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections

DMT : DiMycolate de Tréhalose

ESI-MS : ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GL : couche granuleuse

IWZ : Inner Wall Zone

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight

MMT : MonoMycolate de Tréhalose

MWZ: Medial Wall Zone

nanoLC : nanoLiquid Chromatography

OM : Outer Membrane

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG : PhosphatidylGlycérol

PI : PhosphatidylInositol

PIM : PhosphatidylInositol Mannosides

PM : Membrane Plasmique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis



## Table des matières

<b>Chapitre I</b>	<b>Contexte thématique.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>Chapitre II</b>	<b>L'enveloppe des <i>Corynebacterineae</i> .....</b>	<b>- 12 -</b>
II.1	Microscopie par cryofracture.....	- 14 -
II.2	Cryo-microscopie CEMOVIS .....	- 15 -
II.2.1	La membrane plasmique .....	- 17 -
II.2.2	Inner Wall Zone .....	- 17 -
II.2.3	Media Wall Zone.....	- 17 -
II.2.3.1	Le peptidoglycane .....	- 17 -
II.2.3.2	L'arabinogalactane .....	- 20 -
II.2.4	Outer membrane ou la mycomembrane .....	- 22 -
II.2.5	Couche externe .....	- 22 -
<b>Chapitre III</b>	<b>La mycomembrane : barrière de perméabilité.....</b>	<b>- 24 -</b>
III.1	Structure des acides mycoliques .....	- 24 -
III.2	Organisation des acides mycoliques .....	- 26 -
III.3	Biosynthèse des acides mycoliques .....	- 28 -
III.4	Mise en place des acides mycoliques.....	- 29 -
III.4.1	Transport à travers la membrane plasmique .....	- 30 -
III.4.2	Transfert sur les différents accepteurs par les mycoloyltransférases .....	- 32 -
III.4.2.1	Activité des mycoloyltransférases .....	- 32 -
III.4.2.2	Structure générale des mycoloyltransférases.....	- 34 -
III.5	Les protéines de la membrane externe .....	- 37 -
III.5.1	Porines des mycobactéries .....	- 39 -
III.5.1.1	MspA chez <i>M. smegmatis</i> .....	- 39 -
III.5.1.2	OmpA chez <i>M. tuberculosis</i> .....	- 40 -
III.5.2	Porines chez <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 .....	- 41 -
III.5.2.1	Porines cations-sélectives .....	- 41 -
III.5.2.1	Porines anions-sélectives.....	- 42 -
<b>Chapitre IV</b>	<b>Présentation des travaux.....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>Chapitre V</b>	<b>O-mycoloylation : nouvelle modification post-traductionnelle .....</b>	<b>- 52 -</b>

V.1	Identification et caractérisation biochimique de la modification .....	- 52 -
V.1.1	Identification de la modification post-traductionnelle par spectrométrie de masse .....	- 53 -
V.1.2	Caractérisation de la mycoloylation par traitement alcalin .....	- 55 -
V.1.2.1	Analyse de la phase aqueuse .....	- 58 -
V.1.2.2	Analyse de la phase organique .....	- 60 -
V.1.3	Confirmation de la mycoloylation de PorA, PorH, et la protéine X à l'aide de mutants des voies de biosynthèse des acides mycoliques .....	- 62 -
V.1.4	Localisation de la modification post-traductionnelle .....	- 64 -
V.1.4.1	Localisation par MS-MS .....	- 64 -
V.1.4.2	Localisation par mutagenèse dirigée sur PorA .....	- 65 -
V.1.4.3	Localisation par mutagenèse dirigée sur PorH .....	- 67 -
V.2	Impact de l'acylation sur l'activité porine de PorA-PorH .....	- 68 -
V.2.1	Purification et problèmes rencontrés .....	- 68 -
V.2.2	Mesure d'activité par « Black lipid membrane » .....	- 70 -
<b>Chapitre VI</b>	<b>Identification de la protéine X .....</b>	<b>- 73 -</b>
VI.1	Construction du mutant $\Delta cg2875::km$ .....	- 77 -
VI.2	Analyse du mutant de délétion $\Delta cg2875::km$ (souche CGL2060) .....	- 78 -
<b>Chapitre VII</b>	<b>cMytC : mycolyltransférase responsable de la O-mycoloylation des protéines ? .....</b>	<b>- 80 -</b>
VII.1	Construction du mutant d'insertion <i>cmytC</i> <sup>-</sup> .....	- 81 -
VII.2	Analyse par spectrométrie de masse de la souche <i>cmytC</i> <sup>-</sup> (souche CGL2059) .....	- 82 -
VII.3	Complémentation du mutant d'interruption <i>cmytC</i> <sup>-</sup> .....	- 83 -
VII.4	Analyse du profil lipidique de la souche CGL2059 ( <i>cmytC</i> <sup>-</sup> ) .....	- 85 -
VII.4.1	Quantification des acides mycoliques .....	- 85 -
VII.4.2	Quantification du MMT et du DMT par marquage au [1- <sup>14</sup> C]-palmitate..	- 86 -
<b>Chapitre VIII</b>	<b>Recherche de protéines mycoloylées chez les <i>Corynebacterineae</i> .....</b>	<b>- 89 -</b>
VIII.1	Recherche de protéines orthologues à PorA, PorH et protéine X .....	- 89 -
VIII.2	Recherche de protéines homologues à cMytC .....	- 92 -
<b>Chapitre IX</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>Chapitre X</b>	<b>Publications .....</b>	<b>- 101 -</b>



X.1	“O-mycoloylated proteins from <i>Corynebacterium</i> : an unprecedented post-translational modification in bacteria.”	- 101 -
X.2	“Partial redundancy in the synthesis of the D-arabinose incorporated in the cell wall arabinane of <i>Corynebacterineae</i> ”	- 103 -
X.3	“Identification of a Stress-Induced Factor of <i>Corynebacterineae</i> That Is Involved in the Regulation of the Outer Membrane Lipid Composition”	- 105 -
<b>Chapitre XI Matériel et Méthodes</b>		<b>- 107 -</b>
XI.1	Souches bactériennes	- 108 -
XI.1.1	Souches corynebactériennes	- 108 -
XI.1.1.1	Conditions et milieux de culture	- 108 -
XI.1.1.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 et Res167	- 108 -
XI.1.1.3	<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ porA-porH	- 108 -
XI.1.1.4	<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ pks13::km, $\Delta$ fadD32::km, $\Delta$ accD4::km	- 109 -
XI.1.1.5	<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ otsA $\Delta$ treY $\Delta$ treS	- 109 -
XI.1.1.6	<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	- 110 -
XI.1.1.7	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C8 <sub>r</sub> (-) Tox - ATCC 11913	- 110 -
XI.1.2	Autres souches bactériennes	- 111 -
XI.1.2.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	- 111 -
XI.1.2.2	<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	- 111 -
XI.1.2.3	<i>Gordonia bronchiolus</i> DSM 43247	- 111 -
XI.1.2.4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	- 111 -
XI.1.2.5	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	- 112 -
XI.2	Biologie Moléculaire	- 112 -
XI.2.1	Purification de l’ADN génomique de <i>C. glutamicum</i> Res167	- 112 -
XI.2.2	Préparation des bactéries électrocompétentes	- 113 -
XI.2.3	Transformation des bactéries par électroporation	- 113 -
XI.2.4	Electrophorèse sur gel d’agarose	- 114 -
XI.2.5	Construction du mutant de délétion $\Delta$ cg2875::km	- 114 -
XI.2.5.1	Construction du plasmide de délétion pEH2	- 114 -
XI.2.5.1.1	Amplification des séquences amont (AM), aval (AV) et du gène aphIII	- 114 -
XI.2.5.1.2	Digestion et ligation des différents fragments	- 116 -
XI.2.5.2	Transformation et sélection des bactéries <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformées	- 116 -

XI.2.5.3	Transformation et sélection des bactéries <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 transformées .....	- 116 -
XI.2.6	Construction du mutant d'interruption <i>cmytC</i> .....	- 117 -
XI.2.6.1	Construction du plasmide d'interruption du gène cg0413 (pEH1).....	- 117 -
XI.2.6.1.1	Amplification d'une partie de la séquence codante de Cg0413 .....	- 117 -
XI.2.6.1.2	Ligation du fragment de cg0413 dans le vecteur pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> .....	- 118 -
XI.2.6.2	Transformation et sélection des bactéries <i>E. coli</i> DH5a transformées.....	- 118 -
XI.2.6.3	Transformation et sélection des bactéries <i>C. glutamicum</i> Res167 transformées.....	- 118 -
XI.2.6.4	Complémentation du mutant <i>cMytC</i> .....	- 119 -
XI.2.6.4.1	Plasmide de complémentation pMC6.....	- 119 -
XI.2.6.4.2	Transformation et sélection des bactéries <i>C. glutamicum</i> <i>cMytC</i> complémentées .....	- 119 -
XI.3	Biochimie des protéines .....	- 119 -
XI.3.1	Gel SDS-PAGE .....	- 119 -
XI.3.1.1	Protocole de Laemmli.....	- 119 -
XI.3.1.2	Protocole de Schägger .....	- 120 -
XI.3.2	Western-blot .....	- 120 -
XI.3.3	Purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions.....	- 120 -
XI.3.4	Purification par chromatographie d'exclusion en solvant organique.....	- 121 -
XI.3.5	Purification par HPLC.....	- 121 -
XI.4	Caractérisation de la modification post-traductionnelle .....	- 122 -
XI.4.1	Extraction des bactéries par des solvants organiques.....	- 122 -
XI.4.2	Déacylation alcaline des protéines acylées .....	- 122 -
XI.4.2.1	Analyse de la phase aqueuse .....	- 123 -
XI.4.2.2	Analyse de la phase organique .....	- 123 -
XI.4.2.2.1	Méthylation des acides mycoliques.....	- 123 -
XI.4.2.2.2	Triméthylsilylation des acides mycoliques .....	- 124 -
XI.5	Marquage au [1- <sup>14</sup> C]-palmitate .....	- 124 -
XI.6	Analyse quantitative des lipides.....	- 124 -
XI.6.1	Quantification des acides mycoliques issus des « lipides extractibles ».....	- 125 -
XI.6.2	Quantification des acides mycoliques issus des « lipides liés ».....	- 125 -

XI.6.3	Quantification des lipides extractibles après marquage métabolique au [1- <sup>14</sup> C]-Palmitate.....	- 126 -
XI.7	Analyse qualitative des « lipides extractibles » .....	- 126 -
XI.8	Spectrométrie de masse.....	- 127 -
XI.8.1	MALDI-TOF .....	- 127 -
XI.8.1.1	Détection en mode linéaire .....	- 127 -
XI.8.1.2	Détection en mode réflectron .....	- 128 -
XI.8.2	nanoLC-ESI-MS-MS .....	- 128 -
XI.8.2.1	Préparation des échantillons .....	- 128 -
XI.8.2.2	Analyse nanoLC-ESI-MS/MS.....	- 128 -
XI.8.2.3	Interrogations des banques de données .....	- 129 -
XI.9	Chromatographie en phase gazeuse .....	- 129 -
XI.10	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) .....	- 130 -
XI.11	Analyse bioinformatique.....	- 130 -
XI.11.1	Recherche de candidats pour la protéine X .....	- 130 -
XI.11.1	Recherche d'homologues de la protéine cMytC chez les <i>Corynebacterineae</i> ... .....	- 130 -
<b>Bibliographie</b>	.....	<b>- 131 -</b>

## Chapitre I Contexte thématique

L'équipe dirigée par le Dr M. Daffé, « Enveloppes mycobactériennes : structure, biosynthèse et rôles » s'intéresse à la biogenèse de composés essentiels de l'enveloppe des *Corynebacterineae*, cibles potentielles de nouveaux antituberculeux. Du fait du développement de souches de *Mycobacterium tuberculosis*, multi- et ultra-résistantes aux antibiotiques ainsi que de la co-infection avec le VIH responsable de la recrudescence du nombre de cas de tuberculose depuis les années 90, l'OMS a placé comme un enjeu prioritaire la recherche de nouvelles cibles antituberculeuses et la mise au point de vaccins efficaces.

Les *Corynebacterineae* appartiennent à la classe des Actinobactéries constituant l'une des deux divisions principales des bactéries de type Gram<sup>+</sup>. Cette division se caractérise par des bactéries ayant un fort pourcentage en G+C au sein de leur ADN contrairement à la deuxième division des bactéries Gram<sup>+</sup> : les Firmicutes. En effet, la composition en base d'ADN des *Corynebacterineae* se situe entre 46% et 71% de G+C (Liebl, 2005). Le sous-ordre des *Corynebacterineae* regroupe différentes familles de bactéries dont notamment les *Corynebacteriaceae* comprenant les genres *Corynebacterium* et *Turicella*, les *Mycobacteriaceae* (genre *Mycobacterium*), les *Nocardiaceae* avec les genres *Nocardia* et *Rhodococcus* et les *Gordoniaceae* (genre *Gordonia*). L'ensemble de ces bactéries se caractérise par une morphologie de bâtonnets droits ou légèrement incurvés avec pour certaines des extrémités légèrement renflées donnant une image de massue. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulantes qui s'arrangent soit en forme de V soit en palissade (Figure 1).



**Figure 1 :** Observation de *C. glutamicum* par microscopie électronique à balayage (<http://www.flickr.com/photos/ajc1/page62/>)

Les *Corynebacterineae* se retrouvent dans de nombreux environnements différents comme dans les sols, les plantes, les animaux ou chez l'homme. Certaines de ces familles présentent un intérêt important par la présence de bactéries pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium leprae*, *Rhodococcus equi*...) ou possédant un attrait industriel comme par exemple *Corynebacterium glutamicum*.

Ces bactéries se caractérisent par une enveloppe atypique présentant notamment un polysaccharide particulier, l'arabinogalactane relié au peptidoglycane et des acides gras spécifiques que sont les acides mycoliques dont on sait qu'ils s'organisent pour former une mycomembrane responsable de la faible perméabilité de l'enveloppe aux composés hydrophiles. Le passage des nutriments à travers l'enveloppe, nécessaire à la survie de la bactérie, est permis grâce à la présence de porines, mais ces protéines sont à ce jour assez peu connues chez ce sous-groupe de bactéries.

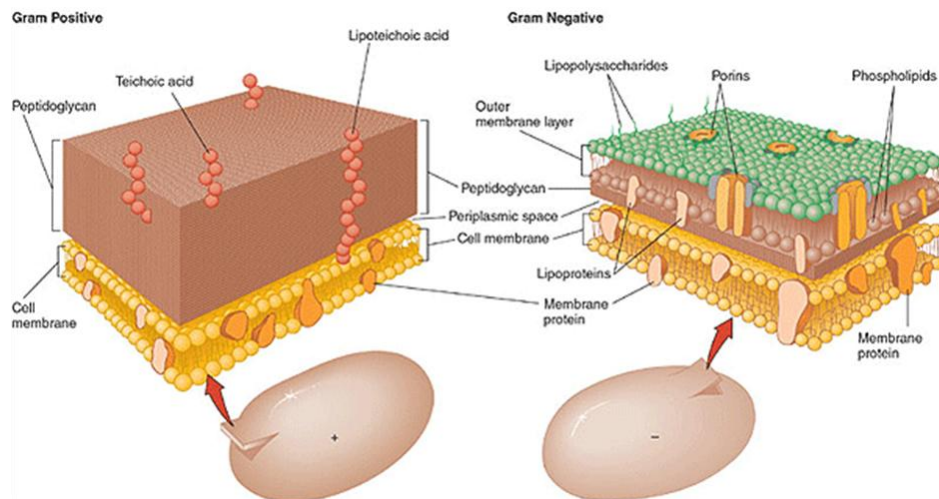
Au sein de l'équipe, nous travaillons sur la biogénèse de l'enveloppe de *Corynebacterium glutamicum*, car cette bactérie présente une enveloppe de structure proche et simplifiée de celle des mycobactéries et des travaux au laboratoire ont montré qu'elle constitue un très bon modèle d'étude du métabolisme mycobactérien. De plus, *C. glutamicum* a la caractéristique de tolérer l'absence de certains composés essentiels chez les mycobactéries comme les acides mycoliques ou l'arabinogalactane. Il s'agit d'une bactérie non pathogène à croissance rapide permettant l'expression des gènes des autres *Corynebacterineae*. L'étude de la biosynthèse de ces composés spécifiques tels que les acides mycoliques ou l'arabinogalactane chez *C. glutamicum* a permis d'identifier des enzymes clés du métabolisme mycobactérien permettant ainsi de définir de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la tuberculose ou de la lèpre.

Outre le fait que *C. glutamicum* est étudié dans le cadre de la compréhension de la mise en place de l'enveloppe des *Corynebacterineae*, il s'agit aussi d'un organisme très étudié du point de vue industriel pour la production d'acides aminés, en particulier le glutamate ou la lysine très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'exhausteur de goût ou additif alimentaire (Hermann, 2003).

## Chapitre II L'enveloppe des *Corynebacterineae*

La caractéristique majeure des *Corynebacterineae* est la présence d'une enveloppe atypique pour des bactéries dites Gram<sup>+</sup>. Les bactéries sont généralement classées en deux groupes selon la morphologie de leur enveloppe qui est étroitement associée à la réponse à la coloration de Gram.

Les bactéries Gram<sup>+</sup> sont généralement caractérisées par la présence d'un peptidoglycane épais (20 à 80 nm) séparé de la membrane plasmique par un espace périplasmique tandis que les bactéries dites Gram<sup>-</sup> possèdent au-dessus du périplasma un peptidoglycane fin (1 à 8 nm) sur lequel repose une deuxième bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des porines permettant le passage de composés hydrophiles nécessaire à la survie de la bactérie (Figure 2).



**Figure 2 :** Représentation de la structure des deux types d'enveloppe Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> (d'après <http://water.me.vccs.edu/courses/env108/lesson5b.htm>)

Les *Corynebacterineae* se caractérisent par l'originalité de leur enveloppe tant à la fois par la spécificité de ses composés dont l'étude approfondie permet d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et la compréhension du métabolisme de certaines souches industrielles qu'à son organisation proche des bactéries Gram<sup>-</sup> avec notamment la présence d'une couche hydrophobe. Cette enveloppe si particulière est composée d'un peptidoglycane qui se lie de façon covalente à un premier composé spécifique de ces espèces, l'arabinogalactane. Ce polysaccharide est à son autre extrémité estérifié par les acides mycoliques, autres composés spécifiques de ce sous ordre des actinomycètes. Il s'agit d'acides gras à longues chaînes  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés. Cette couche hydrophobe est surmontée par une couche externe composée de sucres et de protéines avec quelques lipides (Figure 3).

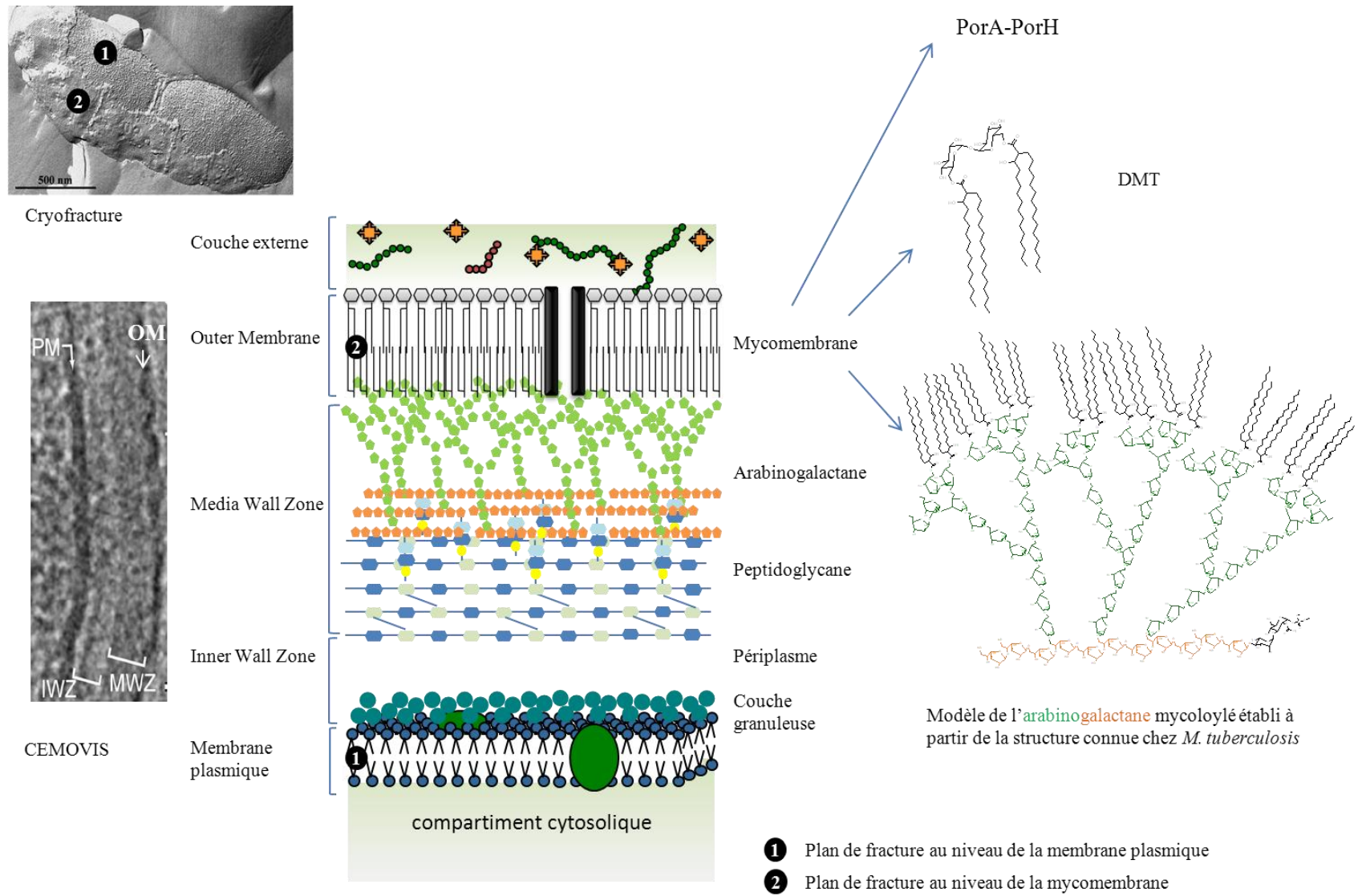


Figure 3 : Modèle de l'enveloppe de *Corynebacterium glutamicum* établi à partir des données de cryofracture et du CEMOVIS (Zuber *et al*, 2008)

Cette enveloppe joue un rôle dans le maintien de la forme cellulaire et de la pression osmotique mais il s'agit surtout d'une barrière de perméabilité efficace pour la résistance intrinsèque aux antibiotiques qui permet une survie de la bactérie dans des conditions hostiles. L'agencement des différents éléments de l'enveloppe des *Corynebacterineae* a été au centre de nombreuses études ces trente dernières années. Différents modèles ont été établis au fur et à mesure de l'évolution des techniques de microscopie en particulier sur l'arrangement des lipides notamment dans la formation d'une membrane externe (Hoffmann *et al*, 2008; Minnikin, 1982; Rastogi, 1991; Zuber *et al*, 2008). La présence d'une membrane externe a été démontrée, pour la première fois, par la technique de microscopie par cryofracture. Ceci a été confirmé par l'étude récente des *Corynebacterineae* par la technique de CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections) qui a permis, pour la première fois, une visualisation claire de la membrane externe de l'enveloppe des *Corynebacterineae*.

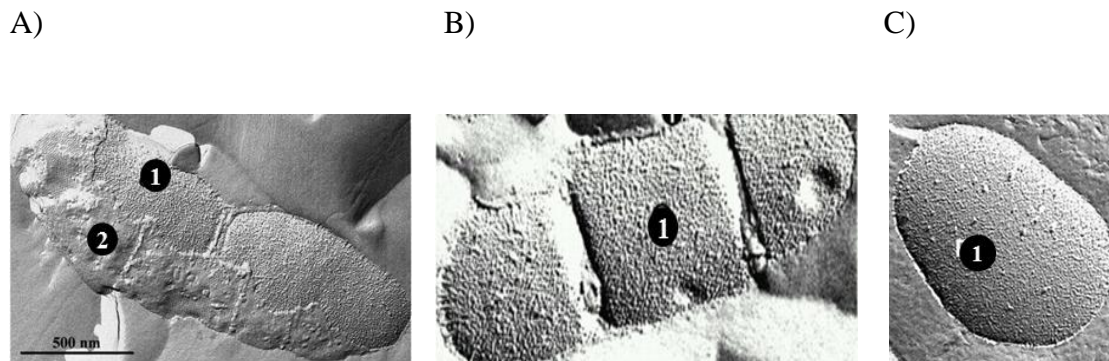
## II.1 Microscopie par cryofracture

La cryofracture (ou encore appelée le cryodécapage) associée à la microscopie électronique est une technique permettant l'observation de feuilletts membranaires ainsi que leurs protéines associées, après congélation rapide dans l'azote liquide suivie d'une coupure par un microtome et d'un dépôt de métaux lourds. Le plan de fracture se situe au niveau de zones hydrophobes où la résistance est faible ce qui est le cas entre les feuilletts interne et externe de la membrane plasmique.

Cette technique a permis d'identifier pour la première fois la présence d'une membrane externe chez les *Corynebacterineae* (Barksdale & Kim, 1977; Nguyen *et al*, 1979). L'étude de Puech *et al* chez *C. glutamicum* a montré la présence de deux plans de fracture : un au niveau de la membrane plasmique se caractérisant par un aspect très granuleux dû à la forte proportion de protéines membranaires et le deuxième situé au niveau de l'enveloppe plus lisse pouvant correspondre à une membrane externe analogue à celle observé chez les bactéries Gram<sup>-</sup> (Figure 4A) (Puech *et al*, 2001). Cette démonstration est appuyée par l'analyse par cryofracture de *C. amycolatum*, dépourvue d'acides mycoliques, qui présente uniquement un plan de fracture au niveau de la membrane plasmique (Figure 4B). En 2004, l'analyse par cryofracture du mutant  $\Delta pks13::km$  dépourvu d'acides mycoliques de *C. glutamicum* a montré la présence d'un seul plan de fracture au niveau de la membrane plasmique ce qui est corrélé avec l'absence de biosynthèse d'acides mycoliques (Figure 4C) (Portevin *et al*, 2004). Ceci



signifie que les acides mycoliques sont essentiels à la formation de cette deuxième bicouche chez les *Corynebacterineae*.



**Figure 4 :** Etude par cryofracture de l'enveloppe de différentes souches de *Corynebacterineae* (1 : plan de fracture au niveau de la membrane plasmique ; 2 : plan de fracture au niveau de l'enveloppe) : A) *C. glutamicum* (Bayan *et al*, 2003); B) *C. amycolatum* (Puech *et al*, 2001); C) *C. glutamicum*  $\Delta pks13::km$  (Portevin *et al*, 2004)

## II.2 Cryo-microscopie CEMOVIS

A part la cryofracture, aucune technique de microscopie électronique n'avait permis d'identifier et de visualiser la membrane externe des *Corynebacterineae*. En effet, lors de la microscopie classique, l'échantillon est, après la fixation chimique, déshydraté puis les molécules d'eau sont substituées par des solvants organiques ce qui peut entraîner des altérations de l'échantillon. Un des objectifs actuels de la microscopie est l'amélioration de la préparation de l'échantillon pour se rapprocher de l'état natif sans artefacts. Une des méthodes est de conserver l'hydratation de la cellule par vitrification à très basse température sous haute pression dans l'azote liquide afin d'obtenir un échantillon congelé sans cristaux de glace. L'échantillon est ensuite cryo-sectionné puis observé sur un cryo-microscope afin de maintenir les conditions nécessaires à l'état de vitrification (CEMOVIS).

L'étude par cette technique de différentes *Corynebacterineae* (*M. bovis*, *M. smegmatis*, *C. glutamicum* et *C. glutamicum*  $\Delta pks13::km$  mutant dépourvu d'acides mycoliques) a permis en comparaison avec des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> d'établir un nouveau modèle d'organisation de l'enveloppe des *Corynebacterineae* (Figure 5 ; Tableau 1). Comme pour la microscopie électronique classique, des zones de densité aux électrons différentes sont observées (Figure 5A).

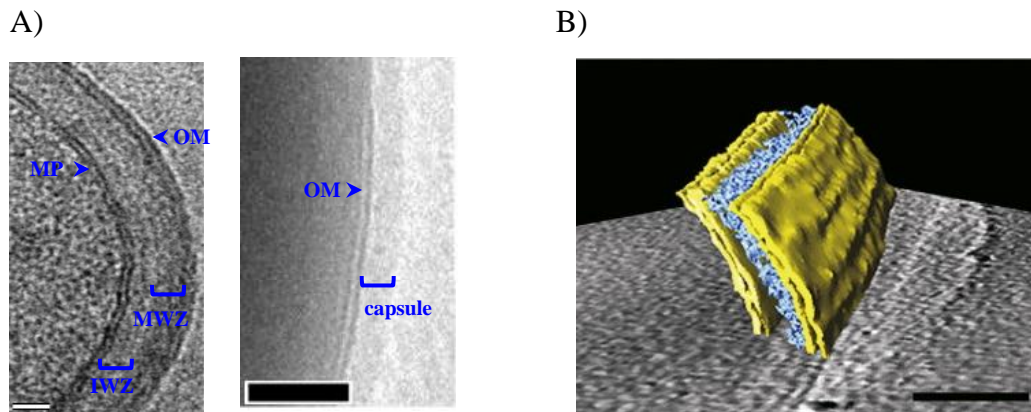


Figure 5 : Ultrastructure de l'enveloppe des *Corynebacterineae* par la technique CEMOVIS : A) Cryo-electron micrographies de *M. smegmatis* (Sani *et al*, 2010; Zuber *et al*, 2008) ; B) Modélisation 3D de l'enveloppe mycobactérienne en jaune les bicouches lipidiques et en bleu le complexe peptidoglycane-arabinogalactane (Niederweis *et al*, 2010)

Espèce	Enveloppe (nm)	Membrane plasmique (nm)	Couche granuleuse (nm)	IWZ (nm)	MWZ (nm)	Membrane externe (nm)
<i>M. smegmatis</i>	42,4 ±2,3	7,1 ±0,6	3,6 ±0,9	16,6 ±1,2	7,3 ±1,9	7,1 ±0,6
<i>M. bovis</i> BCG	38,7 ±2,4	6,3 ±0,7	3,8 ±0,8	14,4 ±1,6	6,3 ±1,0	7,5 ±0,8
<i>C. glutamicum</i>	48,6 ±6,7	6,7 ±0,4	4,3 ±0,8	18,0 ±1,4	20,9 ±8,8	4,7 ±0,7
<i>C. glutamicum</i> $\Delta pks13::km$	37,2 ±4,1	5,5 ±0,5	3,6 ±0,3	15,4 ±2,0	18,7 ±3,2	Absent
<i>E. coli</i>	33,7	5,8 ±0,4	Absent	11,5	6,4 ±0,5	6,9 ±1,0
<i>Streptococcus gordonii</i>	45,5 ±3,4	6,3 ±0,3	4,1 ±0,9	12,9 ±1,0	26,4 ±3,6	Absent

Tableau 1 : Mesures des différentes couches de l'enveloppe obtenues par la technique de CEMOVIS sur différentes souches de *Corynebacterineae* et des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> (Zuber *et al*, 2008)

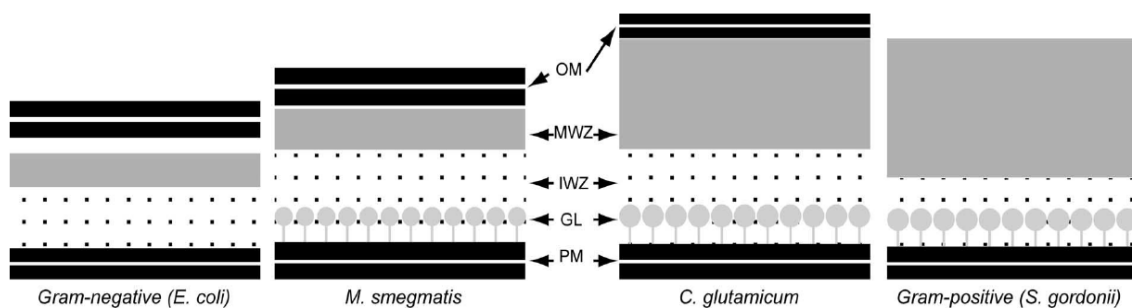


Figure 6 : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à partir des résultats de CEMOVIS (Zuber *et al*, 2008)

## II.2.1 La membrane plasmique

Tout d'abord et commune à toutes les espèces, une zone de forte densité aux électrons est visualisée correspondant à la membrane plasmique entre 5 et 7 nm. La membrane plasmique des *Corynebacterineae* ne présente pas de différence majeure avec celles des autres bactéries. En effet, il s'agit d'une bicouche lipidique composée essentiellement de phospholipides associés à des protéines. Les phospholipides principaux retrouvés dans ces espèces sont le phosphatidylglycérol (80% chez *C. glutamicum* (Daffé, 2005)), le diphosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol et ses dérivés comme les phosphatidylinositol mannosides (PIM<sub>2</sub> à PIM<sub>6</sub>) sous différentes formes d'acylation (1 à 4 acides gras) en faible quantité chez les corynebactéries et la phosphatidyléthanolamine retrouvée uniquement chez les mycobactéries, les rhodococci et les nocardia (Barton *et al*, 1989; Brennan & Nikaido, 1995). Leur partie hydrophobe est constituée d'acides gras saturés, en particulier l'acide palmitique (C16:0), insaturés avec l'acide oléique (C18:1) ou par l'acide 10-méthylheptadécanoïque appelé aussi acide tuberculostéarique.

## II.2.2 Inner Wall Zone

Ensuite, on observe une zone de faible densité (IWZ) correspondant à un espace périplasmique comme chez les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> et de taille comparable. Dans cette zone, on distingue une couche un peu plus dense uniquement présente chez les bactéries Gram<sup>+</sup> appelée couche granuleuse (GL).

## II.2.3 Media Wall Zone

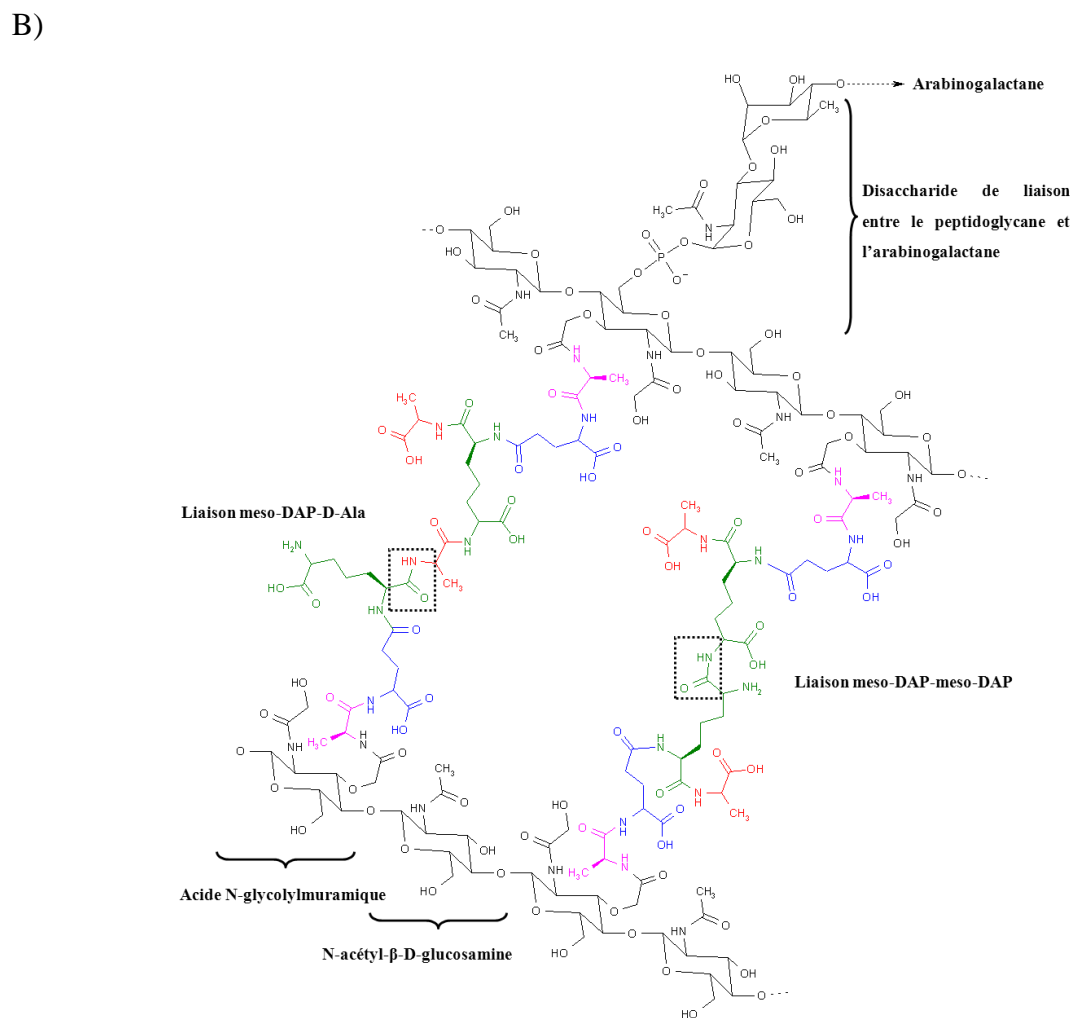
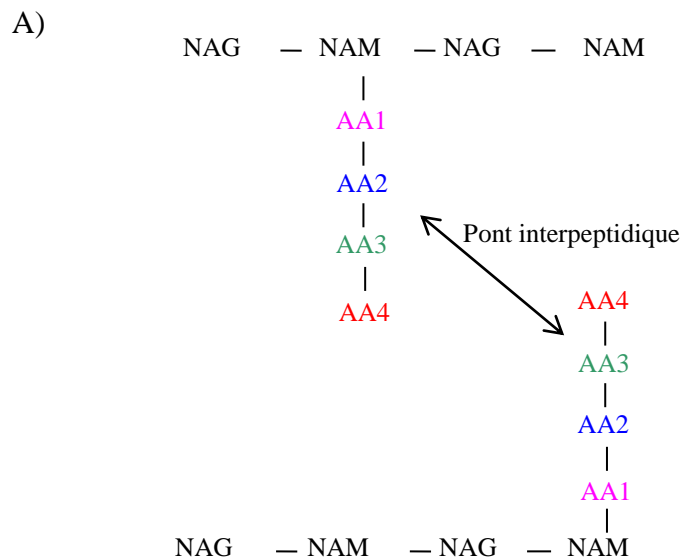
Au-dessus de cette zone interne, se situe une zone de densité intermédiaire (MWZ) correspondant au peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Chez les *Corynebacterineae*, il s'agit probablement du complexe peptidoglycane-arabinogalactane. De façon étonnante, chez les mycobactéries, cette couche est fine (7 nm) de taille équivalente à celle de *E. coli* tandis que chez les corynebactéries, la couche MWZ est plus épaisse (21 nm), du même ordre de grandeur que le peptidoglycane des bactéries Gram<sup>+</sup> (26 nm) (Figure 6).

### II.2.3.1 *Le peptidoglycane*

Il s'agit une structure macromoléculaire d'oses et d'acides aminés constituant un maillage autour de la bactérie responsable de sa taille et sa rigidité et la préservant des chocs osmotiques. Il s'agit classiquement d'un polymère de N-acétylglucosamine (NAG) lié en  $\beta$ 1-4

à l'acide N-acétylmuramique (NAM) formant des domaines glycanes qui se connectent entre eux par des ponts peptidiques. En effet, sur le groupement carboxyle de chaque acide muramique se fixe un tri ou tétrapeptide qui se lie à un autre peptide d'une chaîne glycane en vis-à-vis permettant ainsi de former un réseau. Les peptides sont quant à eux constitués d'une alternance d'acides aminés ou de dérivés d'acides aminés de série D et de série L (Figure 7A). Le peptidoglycane des *Corynebacterineae* a une structure commune au type A1 $\gamma$  qui se caractérise par la présence de l'acide *meso*-diaminopimelique (*meso*-DAP) en position 3 permettant la liaison directe par sa deuxième fonction amine avec la fonction carboxylique de la D-Alanine terminale de l'autre tétrapeptide (Figure 7B). Cependant, il présente quelques variations comme la présence d'un groupement glycolyle chez les mycobactéries ou les nocardia à la place de l'acétyle de l'acide muramique comme retrouvés chez les corynébactéries, l'amidation du groupement carboxyle de l'acide glutamique ou bien la substitution par une glycine (Kato *et al*, 1968). De plus, le mode d'enchaînement des deux peptides peut se faire soit de façon classique entre le *meso*-DAP et la D-Alanine (2/3) soit de façon particulière entre les deux *meso*-DAP (1/3) (Wietzerbin *et al*, 1974).

Mais la particularité du peptidoglycane des *Corynebacterineae* est sa liaison avec un autre polysaccharide : l'arabinogalactane par un lien phosphodiester entre la position 6 d'un acide muramique et le polymère de galactane via un disaccharide de liaison  $\alpha$ -L-Rhamnose 1 $\rightarrow$ 3- $\alpha$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ P) (Figure 7B) (McNeil *et al*, 1990).



**Figure 7 :** A) Schéma général du peptidoglycane (NAM : acide N-acetyl-muramique ; NAG : N-acetyl-glucosamine ; AA : Acide Aminé). B) Structure d'une partie du peptidoglycane de *Corynebacterineae* (Wietzerbin *et al*, 1974)

### II.2.3.2 L'arabinogalactane

L'arabinogalactane est un hétéropolysaccharide ramifié complexe des *Corynebacterineae* constitué de galactose et d'arabinose de série D sous forme furanose formant deux domaines : le domaine galactane et le domaine arabinane.

Chez *M. tuberculosis*, le domaine galactane se lie au peptidoglycane grâce à un disaccharide de jonction et se compose d'une chaîne linéaire d'unités disaccharidiques répétitives de  $[\rightarrow 6\text{-D-Galf}\beta 1 \rightarrow 5\text{-D-Galf}\beta]_{15}$  formant un polymère de 30 unités saccharidiques. Chaque domaine galactane est substitué par trois domaines arabinanes au niveau de la fonction hydroxyle en position 5 des galactofuranosyles 8, 10 et 12 liés en 6. Le domaine arabinane est, quant à lui, une chaîne polysaccharidique ramifiée de  $\alpha$  ou  $\beta$ -D-arabinofuranose. Elle consiste en une première région linéaire composée de 13 unités de 5- $\alpha$ -D-Araf qui est liée à deux extrémités non réductrices du domaine arabinane par un arabinosyle de branchement 3,5- $\alpha$ -D-Araf. L'extrémité non réductrice correspond au motif structural suivant  $[\beta\text{-D-Araf-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Araf}]_2\text{-3,5-}\alpha\text{-D-Araf(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-D-Araf(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-D-Araf(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-D-Araf}$  qui est estérifié pour les 2/3 par des acides mycoliques au niveau de l'hydroxyle en position 5 des arabinoses terminaux (Figure 8) (Daffe *et al*, 1990; McNeil *et al*, 1991).

A ce jour, plusieurs structures d'arabinogalactane ont pu être élucidées, sur la base de l'analyse comparative de leurs spectres RMN du carbone 13 avec ceux obtenus pour *M. tuberculosis*, chez d'autres mycobactéries comme *M. bovis BCG* ou *M. fallax* mais aussi dans d'autres genres apparentés comme *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Tsukamurella* (Daffe *et al*, 1993; Tropis *et al*, 2005a). Ceci a mis en évidence une séquence commune à toutes les espèces seules quelques variations sont présentes d'une espèce à l'autre comme, par exemple, la présence de mannose chez *C. diphtheriae* (Puech *et al*, 2001), la présence d'une D-galactosamine et un groupement succinyle sur l'arabinose de branchement chez *M. tuberculosis* (Bhamidi *et al*, 2008). Chez *C. glutamicum*, il a été mis en évidence la présence d'un autre ose terminal : le rhamnose sous forme pyranosyle lié au niveau de l'hydroxyle en position 2 de  $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{5)-Araf}$  ce qui a été confirmé par l'identification de la rhamnosyltransférase impliquée mais aucune structure complète n'a été déterminée (Alderwick *et al*, 2005; Birch *et al*, 2009).

La spécificité de l'arabinogalactane et son essentialité chez les mycobactéries font de ce polysaccharide une cible majeure pour des antibiotiques. En effet, un antituberculeux de 1<sup>ère</sup> intention, l'éthambutol, inhibe une des enzymes impliquées dans la biosynthèse du domaine arabinane : EmbB. Le gène codant cette protéine se trouve au sein d'un opéron *embCAB* dont des mutations sont responsables de la résistance de certaines souches de *M. tuberculosis* vis à

vis de cet antibiotique. Le développement de nouveaux antituberculeux ciblant l'arabinogalactane passe donc par une meilleure compréhension de sa biosynthèse.

Chez les corynebactéries, le domaine arabinane de l'arabinogalactane n'est pas essentiel à la survie de la bactérie, contrairement aux mycobactéries. Cette caractéristique a donc été mise à profit pour l'identification des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ce polysaccharide. En effet, certaines enzymes connues ont été identifiées par l'intermédiaire du modèle corynébactérien comme AftA impliquée dans le transfert du 1<sup>er</sup> arabinofuranose sur le domaine galactane (Alderwick *et al*, 2006), AftB arabinosyltransférase responsable de la fixation des  $\beta(1\rightarrow2)$  Araf (Seidel *et al*, 2007) ou encore de la décapyrénylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose 2'-epimérase DprE1 impliquée dans formation du décapyrénylphosphoryl-arabinose précurseur de la biosynthèse de l'arabinogalactane et du lipoarabinomannane (Meniche *et al*, 2008). A l'heure actuelle, parmi les différents inhibiteurs développés à visée antituberculeuse, une des plus encourageantes est la benzothiazinone ciblant l'enzyme DprE1 dont l'action a été prouvée *in vitro*, *ex vivo* et dans le modèle murin (Makarov *et al*, 2009).



**Figure 8 :** Structure de l'arabinogalactane chez *M. tuberculosis* (Daffé *et al*, 1990). En vert les domaines arabinanes et en orange le domaine galactane.

## II.2.4 Outer membrane ou la mycomembrane

La zone MWZ est surmontée d'une couche très dense aux électrons formant un double feuillet bien visible. Il s'agit de la membrane externe (Outer membrane OM) (Figure 5B). Chez les mycobactéries, l'épaisseur de la membrane externe est comparable à celle de la membrane plasmique (7 nm) mais aussi à celle de la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup>. Par contre, chez les corynébactéries, cette bicouche est plus fine (4,7 nm) et d'épaisseur inférieure à celle de la membrane plasmique. Cette bicouche est composée essentiellement des acides mycoliques, autres composés spécifiques de ce sous ordre des actinomycètes. Ce sont des acides gras à longues chaînes  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés. L'analyse du mutant  $\Delta pks13::km$  dépourvu d'acides mycoliques chez *C. glutamicum* ATCC13032 montre une disparition de la bicouche (Hoffmann *et al*, 2008; Zuber *et al*, 2008).

La présence d'une couche hydrophobe au sein de l'enveloppe des *Corynebacterineae* est un élément qui rapproche ces bactéries des bactéries Gram<sup>-</sup> contrairement à leur appartenance au groupe des Gram<sup>+</sup>. Une étude comparative de perméabilité entre des bactéries Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une mycobactérie (*M. chelonae*) a permis de montrer que l'enveloppe des mycobactéries a une perméabilité 100 fois inférieure à la plus imperméable des bactéries Gram<sup>-</sup>. Cette propriété est un des éléments à l'origine de la résistance vis-à-vis de certains antibiotiques couramment utilisés dans les infections bactériennes comme par exemple les  $\beta$ -lactames (Jarlier & Nikaido, 1990).

La mycomembrane sera détaillée dans la partie Chapitre III.

## II.2.5 Couche externe

La membrane externe est recouverte d'une zone de faible densité correspondant à la capsule chez les mycobactéries (Figure 5A) (Sani *et al*, 2010). La couche externe, appelée aussi capsule chez les mycobactéries pathogènes, est composée majoritairement de polysaccharides et de protéines avec un faible pourcentage de lipides (2 à 5%) comme des glycolipides (MMT, DMT, sulfolipides ...), phenolglycolipides ou glycopeptidolipides (Lemassu & Daffe, 1994; Lemassu *et al*, 1996; Ortalo-Magne *et al*, 1995). Sa composition varie selon les espèces mais aussi suivant les conditions de culture. Chez *M. tuberculosis*, les polysaccharides représentent environ 35 à 55% et sont essentiellement du glucane, du mannane et de l'arabinomannane. Le glucane, pouvant représenter jusqu'à 80% des polysaccharides capsulaires, est un polysaccharide « glyco-gène-like » constitué d'un enchaînement de glucosyls liés en  $\alpha$ -(1→4) avec des ramifications en 6. Les protéines quant à elles représentent de 40 à 55% dans



lesquelles, chez les mycobactéries, on retrouve les mycoloyltransférases (ou Antigènes 85) impliquées dans le transfert des acides mycoliques sur leurs différents accepteurs ou encore des protéines sécrétées par le système Esx comme ESAT-6 et CFP-10 (Sani *et al*, 2010).

Une étude de la couche externe chez différentes corynébactéries a été effectuée (Puech *et al*, 2001). Les auteurs ont pu montrer que sa composition est différente de celle de *M. tuberculosis* notamment avec l'absence de glucane et qu'elle peut être constituée d'une couche ordonnée d'une seule protéine PS2 appelée S-layer présente chez certaines corynébactéries.

Au niveau de l'enveloppe, on retrouve aussi des lipoglycannes comme par exemple des lipoarabinomannes ou des lipomannanes dont la localisation précise n'a pas encore été établie. Différentes expériences montrent que ces composés sont présents à la surface des bactéries (Pitarque *et al*, 2008; Puech *et al*, 2001) .

*Les Corynebacterineae se caractérisent par une enveloppe particulière pour des bactéries Gram<sup>+</sup>. En plus des différentes couches observées pour une enveloppe « classique » de bactéries Gram<sup>+</sup>, elle possède une deuxième couche dense aux électrons correspondant à une bicouche lipidique externe appelée « mycomembrane » depuis sa mise en évidence (Figure 6). Une meilleure connaissance des zones IWZ avec la couche granuleuse et de la mycomembrane sont un enjeu actuel important car elles sont peu connues en termes d'organisation, de composition, de biosynthèse et de rôles.*

*Pour ce travail, nous nous intéressons par la suite uniquement à la mycomembrane.*

## Chapitre III La mycomembrane : barrière de perméabilité

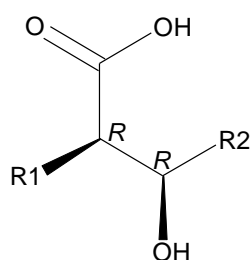
La présence d'une membrane externe chez les *Corynebacterineae* est une explication à la faible perméabilité de leur enveloppe. En effet, cette bicouche est une zone très hydrophobe limitant la diffusion passive des composés hydrophiles ou bien des antibiotiques créant ainsi une barrière de perméabilité. Deux composés importants de la mycomembrane, les acides mycoliques majoritaires dans la mycomembrane d'une part, et d'autres part des protéines seront détaillés afin de mieux comprendre l'organisation et la mise en place de cette membrane externe.

### III.1 Structure des acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés spécifiques du sous-ordre des *Corynebacterineae*. Seules trois espèces appartenant à ce sous-ordre ne possèdent pas d'acides mycoliques ont été décrites : *C. amycolatum*, *C. kroppenstedtii*, *C. atypicum*.

Cependant, les acides mycoliques ne sont pas homogènes dans toutes les genres, de nombreuses variations existent tant au niveau de la longueur de chaîne (de 22 à 90 carbones) qu'au niveau des fonctions chimiques (insaturation, méthoxyle, époxy, cyclopropane...) mais ils possèdent tous le même « motif mycolique » dont les configurations des carbones asymétriques  $\alpha$  et  $\beta$  sont R (Figure 9A) (Asselineau & Asselineau, 1966; Asselineau & Lederer, 1950). Le « motif mycolique » est issu de la condensation de deux acides gras dont les tailles peuvent être différentes créant ainsi une asymétrie. La chaîne appelée R1 est la chaîne latérale de courte taille ne présentant pas ou peu de modifications chimiques. La chaîne R2 est dite chaîne méromycolique de longue taille avec des fonctions chimiques dépendantes de l'espèce (Tableau 2). Les mycobactéries sont les espèces présentant le plus de diversité au niveau des fonctions chimiques. En effet, contrairement aux autres « mycolata », les mycobactéries ne présentent pas d'insaturations au niveau de la chaîne latérale mais comportent, au niveau de la chaîne méromycolique, des motifs particuliers comme des insaturations, des groupements méthyles, des cyclopropanes, des groupements oxygénés de type méthoxyle, époxy, hydroxyle, cétonique ou ester. Ces modifications se répartissent au niveau de deux positions précises sur la chaîne méromycolique dites proximale et distale (Tableau 2).

Les acides mycoliques les plus simples sont retrouvés dans le genre *Corynebacterium*. Ils sont de taille comprise entre 22 et 38 carbones comportant uniquement comme modification 1 à 2 insaturations. Par exemple, les acides mycoliques majoritaire chez *C. glutamicum* sont le C32:0, C34:1 et le C36:2 tandis que chez *C. diphtheriae* Cr8(-) Tox<sup>-</sup> les acides mycoliques majoritaires sont le C30:0 et le C32:0 (Puech *et al*, 2001).



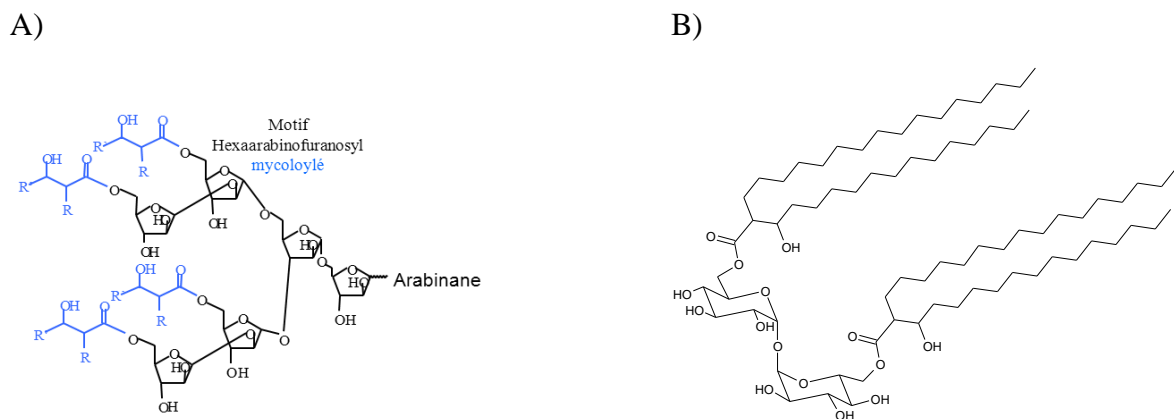
**Figure 9** : Représentation du motif mycolique

Genre	Taille Acide mycolique	Taille R1-COOH	Fonctions chimiques Chaîne latérale	Fonctions chimiques Chaîne méromycolique
<i>Corynebacterium</i>	22-38	8-18	0-1 insaturation	0-1 insaturation
<i>Rhodococcus</i>	34-54	12-16	0-1 insaturation	0-3 insaturations
<i>Nocardia</i>	32-66	12-18	0-1 insaturation	0-4 insaturations
<i>Mycobacterium</i>	60-90	20-26	0	<u>1 proximale</u> : insaturation, méthyle, cyclopropane <u>1 distale</u> : insaturation, méthyle, cyclopropane, ester, méthoxyle, époxy, hydroxyle, cétonique,
<i>Tsukamurella</i>	64-78	20-22	0-1 insaturation	1-5 insaturations
<i>Gordonia</i>	40-66	16-18	0-1 insaturation	0-4 insaturations
<i>Dietzia</i>	30-38	16-18	0-1 insaturation	0-1 insaturation

**Tableau 2** : Longueurs de chaîne et caractéristiques des acides mycoliques des différents genres de *Corynebacterineae* (Chun *et al*, 1997; De Briel *et al*, 1992; Nishiuchi *et al*, 1999; Nishiuchi *et al*, 2000; Puech *et al*, 2001; Rainey *et al*, 1995).

Les acides mycoliques sont retrouvés majoritairement au niveau de l'enveloppe soit liés par une liaison ester à l'extrémité terminale de l'arabinogalactane au niveau de la position 5 des arabinosyls terminaux et antépénultièmes (Figure 10A), soit liés sur le tréhalose ou sur le glucose par estérification de l'hydroxyle en position 6 formant ainsi du mono- ou di-mycolate

de tréhalose (Figure 10B) et du monomycolate de glucose. Ces dérivés d'acides mycoliques sont facilement extractibles par des solvants organiques comme un mélange chloroforme/méthanol et sont retrouvés dans la fraction appelée « lipides extractibles ». Dans un mutant dépourvu de tréhalose, Tropis *et al* ont montré un transfert des acides mycoliques sur d'autres oses comme le maltose ou le maltotriose et ont ainsi défini que la caractéristique essentielle pour le transfert d'un acide mycolique est la présence d'un glucose en position terminale non réductrice d'anométrie  $\alpha$  (Tropis *et al*, 2005b).



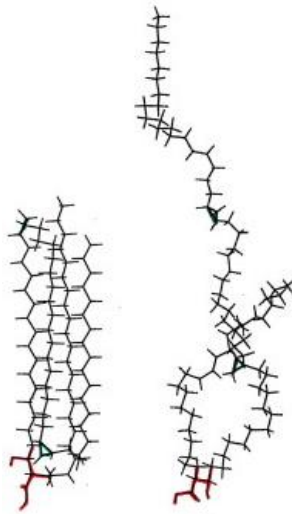
**Figure 10 :** A) Motif hexaarabinofuranosyle terminal mycoloylé du domaine arabinane de l'arabinogalactane de *M. tuberculosis* ; B) Structure du dimycolate de tréhalose chez *C. glutamicum*

### III.2 Organisation des acides mycoliques

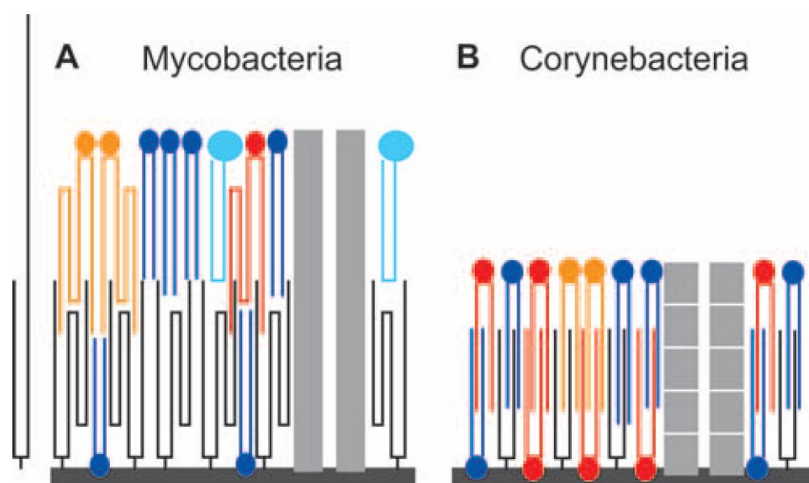
La technique de CEMOVIS montre que l'épaisseur de la mycomembrane est variable suivant l'espèce, ce qui corrèle bien avec la différence de taille des acides mycoliques entre les mycobactéries et les corynebactéries (Tableau 1 ; Tableau 2). Par contre chez les corynebactéries, la mycomembrane est de taille inférieure à la membrane plasmique (4-5 nm). Au niveau de la membrane plasmique, l'épaisseur correspond à la taille de deux chaînes d'acides gras classiques superposées c'est-à-dire entre 30 et 40 carbones, soit 5 à 7 nm ; or les acides corynomycoliques sont le résultat de la condensation de deux acides gras classiques (C16-C18), ce qui n'implique pas un repliement différent de celui des phospholipides. Pour expliquer une taille inférieure à la superposition de deux phospholipides, il a donc été proposé une intercalation des acides corynomycoliques (Figure 12B) (Zuber *et al*, 2008).

Chez les mycobactéries, malgré une intercalation des acides mycoliques, cela ne suffit à expliquer que la taille de la mycomembrane chez les mycobactéries (7-8 nm) soit équivalente à celle de la membrane plasmique. En effet, la conformation linéaire de la chaîne

méromycolique de l'acide mycolique représente une longueur entre 40 à 70 carbones. Mais, la modélisation de l'acide mycolique a permis de montrer que la présence de deux groupes fonctionnels en position proximale et distale sur la chaîne méromycolique entraîne des courbures qui permettent à l'acide mycolique d'adopter une conformation repliée dite en W (Figure 11) (Villeneuve *et al*, 2005; Villeneuve *et al*, 2007; Villeneuve *et al*, 2010). La conformation W associée à l'intercalation des acides mycoliques permettrait d'obtenir une épaisseur comparable à celle de la membrane plasmique (Figure 12A) (Zuber *et al*, 2008).



**Figure 11 :** Modélisation d'acides mycoliques de mycobactéries A) conformation W B) conformation linéaire (Villeneuve *et al*, 2010)



**Figure 12 :** Représentation schématique de la mycomembrane (Zuber *et al*, 2008) A) chez les mycobactéries B) chez les corynebactéries (Jaune : DMT, Bleu foncé : Phospholipides, Rouge : MMT, Bleu clair : GPL, Gris : porines)

### III.3 Biosynthèse des acides mycoliques

De même que pour l'arabinogalactane, les acides mycoliques sont des composés essentiels chez les mycobactéries et leurs voies de biosynthèse sont des cibles privilégiées pour le développement d'antituberculeux.

Les corynébactéries tolèrent l'absence d'acides mycoliques mais dans ce cas, l'utilisation du modèle corynebactérien se restreint uniquement aux étapes terminales de la biosynthèse du fait de leur différence en termes de taille et de modifications chimiques.

De façon simplifiée, la synthèse d'un acide mycolique résulte de la condensation effectuée par l'enzyme Pks13 de deux acides gras, l'un activé sous forme Acyl-AMP synthétisé par l'enzyme FadD32 et l'autre activé sous forme Carboxyl-acyl-CoA, produit du complexe Acyl-CoA Carboxylase (Acc) (Portevin *et al*, 2004; Portevin *et al*, 2005) pour donner un  $\beta$ -céto-ester ultérieurement réduit par une réductase CmrA (Bhatt *et al*, 2008; Lea-Smith *et al*, 2007). Ces enzymes, essentielles chez les mycobactéries, ont pu être identifiées par délétion des gènes correspondants chez *C. glutamicum*. La différence majeure entre les corynebactéries et les autres membres des « mycolata » se situe en amont lors de la biosynthèse de l'acyl-AMP qui correspond à la future chaîne méromycolique. En effet, les chaînes d'acides gras classiques sont produites par une enzyme multidomaine Fatty Acid Synthase de type I (FAS-I) sous forme Acyl-CoA allant du C8 au C24. Chez *C. glutamicum*, ces chaînes issues de FAS-I sont prises en charge soit par le complexe Acc soit par FadD32 pour former les deux dérivés pour la condensation (Figure 13). *A contrario*, dans les autres genres de *Corynebacterineae*, il existe un deuxième système de synthèse d'acides gras FAS-II permettant l'élongation spécifique de la chaîne méromycolique. Il s'agit d'un système d'élongation multienzymatique permettant d'obtenir un Acyl-ACP (Acyl Carrier Protein) de très longue chaîne allant jusqu'à 56 carbones pour les mycobactéries par ajout d'unités malonyl. D'autres enzymes interviennent afin d'introduire les modifications chimiques comme par exemple les désaturases ou les méthyltransférases (Figure 13) (Marrakchi *et al*, 2008). Les enzymes du système FAS-II et de l'étape finale présentent, de par leur spécificité, des cibles thérapeutiques intéressantes. Par exemple, l'enzyme InhA, énoyl ACP réductase, appartenant au système FAS-II est la cible de l'antibiotique principal dans le traitement de la tuberculose : l'isoniazide (INH) (Banerjee *et al*, 1994).

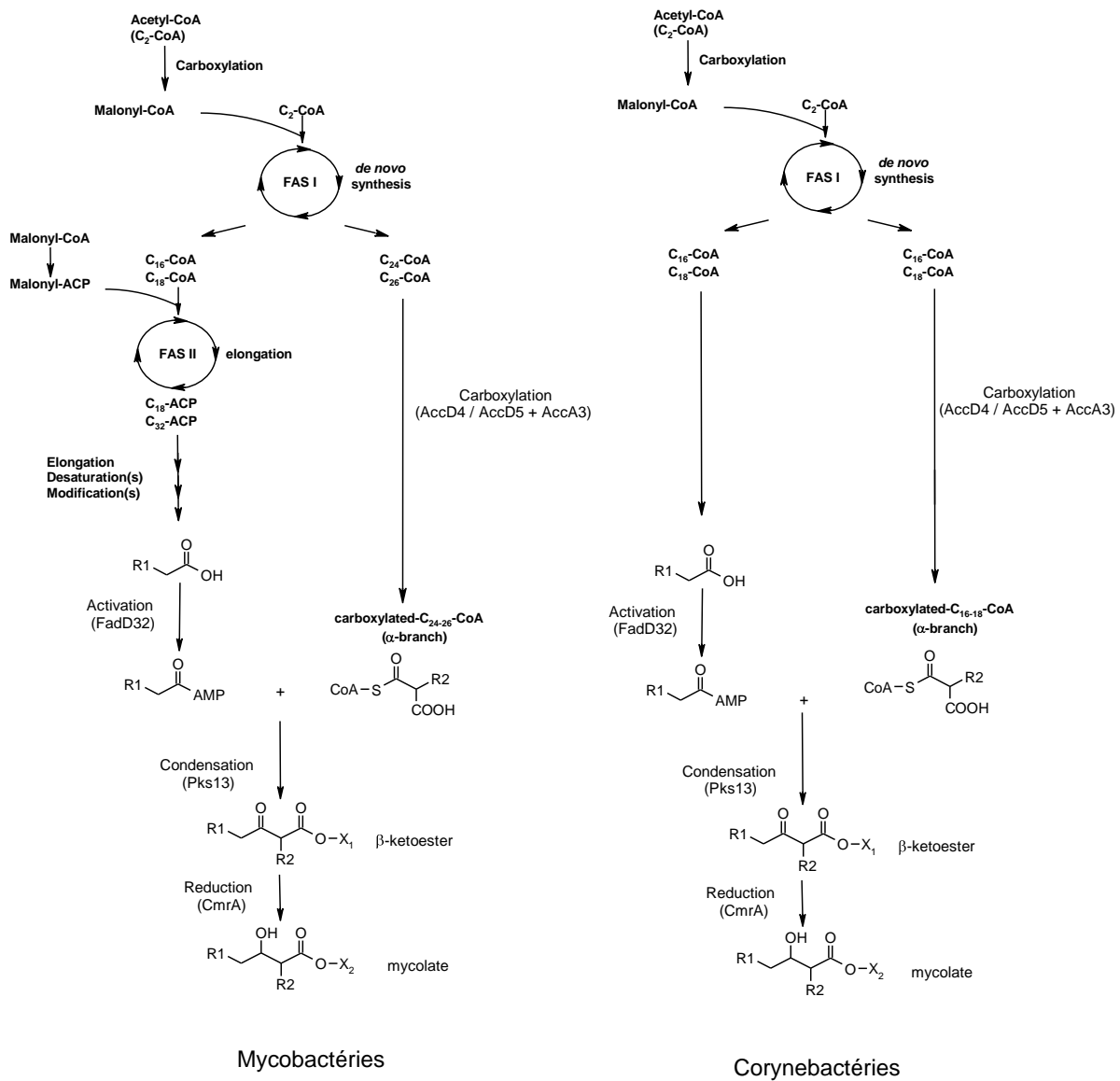


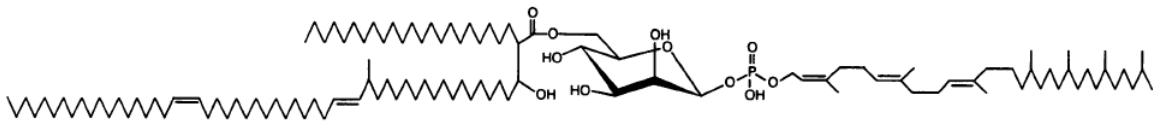
Figure 13 : Biosynthèse des acides mycoliques chez *C. glutamicum* et *M. tuberculosis* (Marrakchi *et al*, 2008)

### III.4 Mise en place des acides mycoliques

Une fois synthétisés, les acides mycoliques sont transférés dans l'enveloppe sur les accepteurs finaux dont les principaux sont le tréhalose et l'arabinogalactane. La fixation de l'acide mycolique sur les accepteurs est bien connue et se fait par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques que sont les mycoloyltransférases. Par contre, pour les étapes de libération du  $\beta$ -cétoester de Pks13 jusqu'à la fixation sur le tréhalose, deux modèles sont proposés mais aucun processus n'est clairement établi.

### III.4.1 Transport à travers la membrane plasmique

Deux transporteurs potentiels d'acides mycoliques ont été décrits permettant le passage de la membrane plasmique vers la mycomembrane chez *M. smegmatis* (Besra *et al*, 1994) et *C. diphtheriae* (Datta & Takayama, 1993). Pour le transporteur de *C. diphtheriae*, la structure n'a pas été complètement élucidée. La structure du transporteur a pu être déterminée chez *M. smegmatis*. Il s'agit d'un mannosylphosphoprenol sur lequel se greffe, en position 6 du mannose l'acide mycolique (Figure 14).



**Figure 14 :** Structure du transporteur d'acide mycolique (Myc-PL) chez *M. smegmatis* (Besra *et al*, 1994).

Il a été proposé par Takayama *et al* (Takayama *et al*, 2005) que l'acide mycolique néo-synthétisé serait transféré sur le mannosylphosphoprenol par une enzyme non identifiée donnant le Myc-PL (Figure 15-1). Cet acide mycolique serait par la suite transféré par une mycoloytransférase sur le tréhalose-6P (Figure 15-2) qui, par l'intermédiaire d'une phosphatase, donnerait le MMT (Figure 15-3). Ce dernier serait transporté à travers l'enveloppe grâce à un transporteur ABC (Figure 15-4).

#### Etapes intracellulaires

- 1) Pks13- $\beta$ -cétoester + mannosylphosphoprenol  $\longrightarrow$  Myc-PL + Pks13
- 2) Myc-PL + tre 6-P  $\longrightarrow$  MMT- 6-P + mannosylphosphoprenol
- 3) MMT-6-P  $\longrightarrow$  MMT + Pi

#### Etape transmembranaire : grâce à un transporteur ABC

- 4) MMT + ATP  $\longrightarrow$  MMT + ADP + Pi

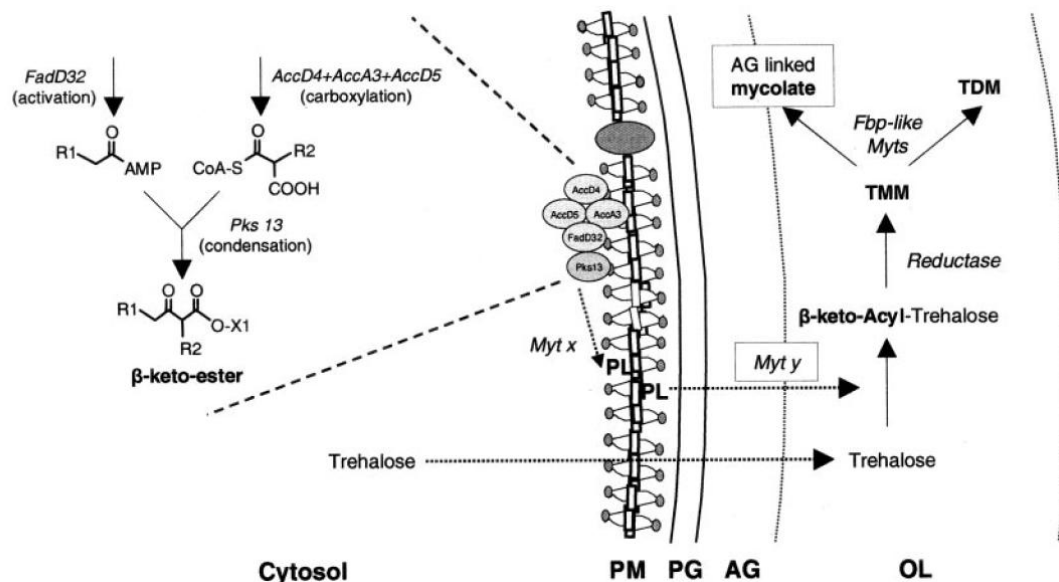
#### Au niveau de l'enveloppe

- 5) MMT + MMT  $\longrightarrow$  DMT + Tréhalose
- 6) MMT + PG-AG  $\longrightarrow$  PG-AG-mycolate + tréhalose

**Figure 15 :** Transfert des acides mycoliques sur les accepteurs finaux : modèle de Takayama (Takayama *et al*, 2005) (MMT Monomycolate de tréhalose ; DMT Dimycolate de tréhalose ; PG-AG peptidoglycane-arabinogalactane)



L'étude chez *C. glutamicum* du mutant dépourvu de tréhalose ( $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$ ) conduit, suivant les conditions de culture (milieu minimum en présence de fructose, acétate, saccharose, pyruvate...), à une absence de biosynthèse et de transfert d'acides mycoliques. L'ajout de glucose, maltose ou maltotriose ainsi qu'un mélange saccharose et tréhalose comme source de carbone restaure la biosynthèse et le transfert des acides mycoliques. Par contre, le tréhalose seul ne constitue pas une bonne source de carbone pour *C. glutamicum* sauvage et  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$ . En conclusion, le tréhalose n'est pas indispensable à la biogénèse de la mycomembrane (Tropis *et al*, 2005b). Les mêmes auteurs ont pu montrer chez le mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  que le tréhalose 6-phosphate n'était pas non plus indispensable à la biogénèse de la mycomembrane. D'autre part, le tréhalose exogène n'étant pas capable d'entrer dans la bactérie, le transfert sur le tréhalose aurait lieu au niveau de l'enveloppe chez ce mutant. À partir de ces résultats, un deuxième modèle a été établi et proposant que le  $\beta$ -cétoester néosynthétisé soit transféré sur un phospholipide transporteur au niveau de la membrane plasmique à l'aide d'une mycoloytransférase X (MytX) puis par l'intermédiaire d'une nouvelle mycoloytransférase Y (MytY), le  $\beta$ -cétoester serait transféré sur le tréhalose, formant le  $\beta$ -cétoacyl tréhalose qui est réduit par CmrA au niveau de l'enveloppe (Figure 16) (Tropis *et al*, 2005b).



**Figure 16 :** Transfert des acides mycoliques sur les accepteurs finaux : modèle de Tropis *et al* (Tropis *et al*, 2005b)

### III.4.2 Transfert sur les différents accepteurs par les mycoloyltransférases

Une fois le monomycolate de tréhalose formé, ce composé permet la formation des autres dérivés de mycolates grâce à des enzymes spécifiques que sont les mycoloyltransférases. Ces enzymes permettent de prendre en charge le MMT et de transférer l'acide mycolique par une réaction de transestérification soit sur l'extrémité hexaarabinosyle de l'arabinogalactane soit sur les différents accepteurs connus comme le MMT pour former le DMT ou bien le glucose ou le glycérol formant ainsi du monomycolate de glucose ou de glycérol. Les mycoloyltransférases sont des protéines sécrétées que l'on retrouve dans le milieu extracellulaire et au niveau pariétal ayant chez certaines espèces comme chez *M. tuberculosis* une activité antigénique. Ces enzymes ont été très étudiées en particulier chez *M. tuberculosis* et chez *C. glutamicum*.

#### III.4.2.1 Activité des mycoloyltransférases

Chez *M. tuberculosis*, quatre gènes codant pour des mycoloyltransférases (Ag85A, B, C et D) ont été identifiés (Cole *et al*, 1998) mais seules trois de ces protéines ont une activité transférase (Ag85A, B et C) (Belisle *et al*, 1997; Kremer *et al*, 2002; Puech *et al*, 2002). L'Ag85C est caractérisé comme la mycoloyltransférase principale impliquée dans le transfert de l'acide mycolique sur l'arabinogalactane mais aucune spécificité de site de mycoloylation n'a pu être mise en évidence pour chaque Ag85. En effet, il existe une certaine redondance entre ces enzymes et donc elles se complètent entre elles (Jackson *et al*, 1999; Puech *et al*, 2002)

Chez *C. glutamicum*, six gènes codant pour des mycoloyltransférases (cMytA-F) ont été identifiés. Deux études ont été effectuées sur les mycoloyltransférases de deux souches différentes de *C. glutamicum* : CGL2005 (De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004; Puech *et al*, 2000) et Res167 qui est une souche dérivée de la souche de référence ATCC13032 (Brand *et al*, 2003). Pour chaque espèce, des mutants de chaque mycoloyltransférase et des doubles mutants ont été effectués afin d'évaluer l'impact de chaque enzyme sur la composition de l'enveloppe. Dans l'étude de Brand *et al*, les mutants ont été comparés avec la souche sauvage d'un point de vue de la composition lipidique (analyse par CCM de la proportion de MMT et de DMT) et d'un point de vue changement morphologique. Seul le simple mutant *cmytA* et les doubles mutants impliquant *cmytA* possèdent un volume cellulaire accru par rapport au sauvage dont le phénotype est restauré par complémentation avec *cmytA* (Brand *et al*, 2003). D'un point de vue lipidique, les phénotypes prépondérants sont observés

uniquement pour les doubles mutants (*cmyt AB*<sup>-</sup>, *AC*<sup>-</sup> et *BC*<sup>-</sup>) ainsi que le triple mutant (*cmytABC*<sup>-</sup>). En effet pour ces souches, une accumulation de MMT est observée, accompagnée d'une diminution ou disparition de DMT sauf pour le double mutant *cmytAC*<sup>-</sup> où le taux de DMT reste stable. L'analyse des lipides du mutant *cmytD*<sup>-</sup> et *cmytF*<sup>-</sup> n'a pas été effectuée et le mutant *cmytE*<sup>-</sup> n'a pu être obtenu.

Dans les études de De Sousa *et al* et Kacem *et al*, les cinq mutants *cmytA*<sup>-</sup>, *cmytB*<sup>-</sup>, *cmytC*<sup>-</sup>, *cmytD*<sup>-</sup> et *cmytF*<sup>-</sup> ont été obtenus ainsi que le double mutant *cmytAB*<sup>-</sup>. Le gène *cmytE*<sup>-</sup> est quant à lui dans la souche CGL2005 un pseudogène du fait de la présence d'un codon stop au sein de l'ORF. Différentes analyses ont été effectuées sur ces mutants : analyse qualitative des acides mycoliques, quantification des acides mycoliques dit extractibles (MMT, DMT...) ou liés à l'arabinogalactane et analyse morphologique. D'un point de vue phénotypique, aucune différence n'est observée entre les différents simples mutants et la souche sauvage, le double mutant *cmytAB*<sup>-</sup> a quant à lui une croissance altérée et les bactéries ont une morphologie modifiée. Les cellules sont plus longues et un impact sur la division cellulaire a été observé. D'un point de vue lipidique, une forte diminution du DMT et une accumulation de MMT sont observées pour les simples mutants en particulier pour *cmytA*<sup>-</sup>. Pour le simple mutant *cmytC*<sup>-</sup>, aucune modification du rapport MMT/DMT n'est observée. L'analyse des acides mycoliques liés à l'arabinogalactane montre, comme pour les lipides extractibles, une diminution des acides mycoliques pour les simples mutants sauf pour le mutant *cmytC*<sup>-</sup>. En effet, pour les mutants *cmytA*<sup>-</sup> et *cmytB*<sup>-</sup>, il y a une diminution de 50% du taux de mycolates liés à l'arabinogalactane et 60% pour le double mutant. La complémentation de chaque mutant par la protéine qui lui correspond permet la restauration du phénotype sauvage. En complémentation croisée, seule *cmytB* est capable de compléter le mutant *cmytA*<sup>-</sup> au niveau des acides mycoliques en particulier sur l'arabinogalactane contrairement à la complémentation de *cmytA*<sup>-</sup> avec *cmytC*, *cmytD*, *cmytF* qui restaure uniquement la balance MMT/DMT.

En conclusion, il a été montré que cMytA et cMytB ont un rôle prédominant dans le transfert des acides mycoliques, en particulier sur l'arabinogalactane, contrairement à cMytD et F. Malgré la présence des acides aminés du site catalytique, cMytC n'a pas de rôle dans le transfert des acides mycoliques sur le tréhalose ou l'arabinogalactane.

### III.4.2.2 Structure générale des mycoloyltransférases

Les structures des différents Ag85 (mycoloyltransférases de mycobactéries) ont été obtenues par cristallographie aux rayons X (Anderson *et al*, 2001; Ronning *et al*, 2000; Ronning *et al*, 2004; Wilson *et al*, 2004) (Figure 17).

Les mycoloyltransférases sont des enzymes appartenant à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases caractérisées par une triade catalytique de type « Serine-Protease Like », un feuillet central composé de 8 brins  $\beta$  avec, de chaque côté, des hélices  $\alpha$ . Le site catalytique est formé par un coude nucléophile portant la sérine active, une base, l'histidine, et un acide, l'acide glutamique. La liaison du 1<sup>er</sup> substrat, le MMT, se fait par l'intermédiaire d'un long canal hydrophobe de 21Å dans lequel l'acide mycolique est stabilisé par des interactions hydrophobes (Phe, Trp, Phe, Tyr, Ile) et s'ouvrant sur une large poche hydrophobe avec de chaque côté un site de fixation au tréhalose stabilisé par des acides aminés à fort potentiel électrostatique négatif, ayant en son centre le coude nucléophile permettant le transfert d'un substrat à un autre.

L'absence d'activité de l'Ag85D est due à la mutation des acides aminés de la triade catalytique en particulier avec l'absence du coude nucléophile (Ser→Ala) empêchant tout transfert de mycolate (Belisle *et al*, 1997; Kremer *et al*, 2002).

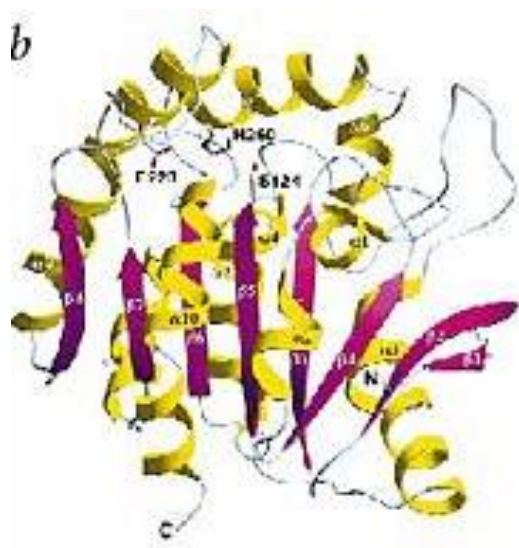
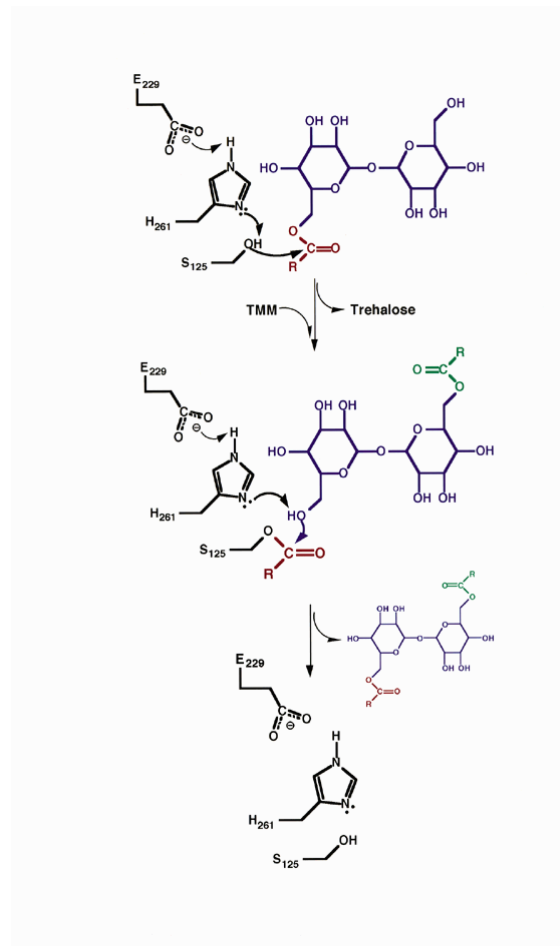


Figure 17 : Structure de l'Ag85C chez *M. tuberculosis* (Ronning *et al*, 2000)

Le transfert de l'acide mycolique du MMT sur le deuxième MMT s'effectue de la façon suivante (Ronning *et al*, 2000) (Figure 18):

- Attaque nucléophile de la fonction C=O de l'ester du 1<sup>er</sup> MMT par la sérine activée
- Fixation de l'acide mycolique sur la sérine catalytique formant un intermédiaire covalent acyl-enzyme et libération du tréhalose
- Fixation du 2<sup>ème</sup> MMT avec sa fonction hydroxyle libre en position 6' en direction du site actif
- Activation de la fonction hydroxyle de l'accepteur par déprotonation du C6'OH grâce au réseau de relais de charge formé par l'acide glutamique et l'histidine
- Attaque nucléophile de la fonction C=O de l'ester de l'acyl-enzyme par le 2<sup>ème</sup> accepteur activé
- Fixation de l'acide mycolique sur la position 6' du MMT formant ainsi le DMT



**Figure 18 :** Mécanisme réactionnel de transfert des acides mycoliques par l'Ag85C (Ronning *et al*, 2000)

A l'heure actuelle, seules des études de modélisation des mycoloyltransférases de *C. glutamicum* ont été effectuées par analogie aux structures obtenues pour les Ag85 (Adindla *et al*, 2004; Ramulu *et al*, 2006). Les mycoloyltransférases de *C. glutamicum* (cMyts) possèdent les mêmes caractéristiques structurales que les Ag85. En effet, la modélisation montre la présence de 8 brins  $\beta$  formant le feuillet central et les hélices  $\alpha$  caractéristiques des  $\alpha/\beta$  hydrolases. De plus, la triade catalytique est très conservée chez toutes les cMyts, ce qui indique qu'elles seraient toutes dotées d'une activité transférase. Une des différences majeures avec les Ag85 est la présence d'une boucle d'insertion entre l'alanine 222 et l'asparagine 223. Cette boucle d'insertion est de taille variable de 3 à 20 résidus selon les cMyts (Figure 19). Les auteurs ont mis en corrélation la taille de cette boucle d'insertion chez les cMyts avec leur activité sur les acides mycoliques. En effet, ils observent que plus la boucle d'insertion est grande, moins la mutation du gène codant pour la mycoloyltransférase a d'impact sur le rapport DMT/MMT et sur les acides mycoliques liés (Tableau 3).



**Figure 19 :** Modélisation des six mycoloyltransférases de *C. glutamicum* ATCC13032 : cMytA, B, C, D, E et F à partir de la structure cristallographique de l'Ag85B (PDB code : 1DQZ). Le cadre rouge représente la zone de la longue boucle d'insertion.

Mycoloyltransférase	Taille boucle d'insertion	DMT/MMT WT = 0.71	AM liés à l'AG WT = 100%
cMytA	4	0.15	50
cMytB	3	0.30	53
cMytC	20	0.68	108
cMytD	7	0.34	59
cMytE	13	nd	nd
cMytF	13	0.43	68

**Tableau 3 :** Comparaison entre la taille de la boucle d'insertion des mycoloyltransférases et la quantification des acides mycoliques après mutation du gène correspondant (Adindla *et al*, 2004; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004).

Les auteurs ont émis comme hypothèse que la boucle d'insertion modifierait les interactions stériques nécessaires à la stabilisation du 2<sup>ème</sup> tréhalose au niveau du 2<sup>ème</sup> site de fixation du substrat en particulier pour la protéine cMytC. Cette protéine possède la plus longue boucle d'insertion associée à des mutations des acides aminés impliqués dans le 2<sup>ème</sup> site de fixation cependant aucune activité liée aux acides mycoliques sur le tréhalose ou l'arabinogalactane n'a pu être identifiée malgré la présence de la triade catalytique (Figure 19). En effet, on observe un taux d'acides mycoliques liés à l'arabinogalactane de 108% et un rapport DMT/MMT de 0.68 ce qui est équivalent aux taux observé dans la souche sauvage (Tableau 3). Cependant, une nuance à cette corrélation est à apporter car le dosage des acides mycoliques a été effectué dans la souche *C. glutamicum* CGL2005 tandis que la modélisation et la comparaison des séquences sont effectuées pour la souche ATCC13032.

*Les mycoloyltransférases sont des enzymes clés dans la mise en place de la mycomembrane. Elles permettent le transfert des acides mycoliques sur les accepteurs finaux que sont l'arabinogalactane qui forme le feuillet interne de cette membrane externe et le tréhalose formant le DMT composé principal du feuillet externe.*

### III.5 Les protéines de la membrane externe

La présence de la mycomembrane chez les *Corynebacterineae* les rapproche d'un point de vue pariétal des bactéries type Gram<sup>-</sup>. Ces bactéries possèdent une membrane externe constituée d'un double feuillet lipidique dans lequel se trouvent des protéines représentant

environ 50% de l'ensemble des constituants de la membrane externe (Koebnik *et al*, 2000). Ce sont essentiellement des protéines membranaires intégrales, dont la caractéristique commune est une structuration en tonneau  $\beta$  (Koebnik *et al*, 2000), ou des lipoprotéines. La membrane externe représente une barrière hydrophobe au sein de l'enveloppe qui limite la diffusion des composés. Chez les bactéries Gram<sup>-</sup>, il existe différentes voies de passage des molécules à travers la membrane externe :

- Diffusion passive des composés hydrophobes à travers les lipides
- Présence de porines permettant le passage des petits composés hydrophiles
- Présence de transporteurs permettant le passage de composés par un processus énergie-dépendant.

La caractérisation complète de la mycomembrane chez les *Corynebacterineae* passe par la recherche et l'étude des protéines de cette membrane externe. Ces protéines sont peu connues du fait de la difficulté à purifier la mycomembrane. Les techniques de fractionnement utilisées jusqu'à récemment permettent de séparer la membrane plasmique du reste de l'enveloppe mais pas d'isoler spécifiquement cette mycomembrane du fait de la liaison covalente peptidoglycane-arabinogalactane-acides mycoliques. Cependant, quelques études ont permis de localiser de façon claire certaines de ces protéines.

Une étude par cryomicroscopie électronique d'un mutant d'une arabinosyltransférase  $\Delta$ AftB impliquée dans la formation de l'extrémité du domaine arabinane de l'arabinogalactane chez *C. glutamicum* Res167 montre la présence de fragments de l'enveloppe dans le milieu extracellulaire constitués des principaux composés de la mycomembrane comme le MMT et le DMT. Grâce à ce mutant, il a été possible, pour la première fois, d'isoler des vésicules de mycomembrane. La purification et l'analyse par protéomique de ces vésicules ont permis d'identifier plusieurs protéines dont notamment cMytA, cMytB, cMytC, cMytE, cMytF et des porines PorA et PorB comme appartenant à la mycomembrane (Bou Raad, 2010; Bou Raad *et al*, 2010).

Une analyse bioinformatique du génome de *M. tuberculosis* basée principalement sur la présence de protéines structurées en feuilletts  $\beta$  amphiphiles prédit l'existence potentielle d'environ 140 protéines de membrane externe contenant, comme chez *C. glutamicum*, entre autres, les mycoloyltransférases et des porines (MspA chez *M. smegmatis* et OmpA chez *M. tuberculosis*) (Song *et al*, 2008). Dans cette même étude, la présence des porines au sein de l'enveloppe a été confirmée par des études de localisation *in vivo* chez *M.bovis* BCG après transformation de la souche avec les gènes des porines MspA et OmpA, suivis d'un fractionnement cellulaire. La présence des porines est très caractéristique de la membrane



externe puisqu'elles permettent l'entrée des petits composés hydrophiles (généralement < 600 Da) dans la bactérie à travers la mycomembrane. Des porines ont été décrites dans la plupart des espèces de *Corynebacterineae* mais les plus étudiées sont celles des mycobactéries et de *C. glutamicum* ATCC13032.

### III.5.1 Porines des mycobactéries

L'identification de porines chez les mycobactéries est bien plus ancienne que la mise en évidence de la mycomembrane. La première porine identifiée chez *M. chelonae* a été mise en évidence par mesure de la conductance d'un extrait de protéines de l'enveloppe reconstituées dans des liposomes en 1992 (Trias *et al*, 1992). Par la suite, des porines ont été identifiées chez différentes mycobactéries (Tableau 4).

Espèces	Gène	PM en kDa monomère/oligomère	Références
<i>M. chelonae</i>	1MspA homologue	59	(Trias <i>et al</i> , 1992)
<i>M. phlei</i>	4 MspA homologues	22/135	(Riess <i>et al</i> , 2001)
<i>M. smegmatis</i>	MspA, B, C, D	20/100	(Niederweis <i>et al</i> , 1999; Stahl <i>et al</i> , 2001)
<i>M. tuberculosis</i>	OmpA	38	(Senaratne <i>et al</i> , 1998)

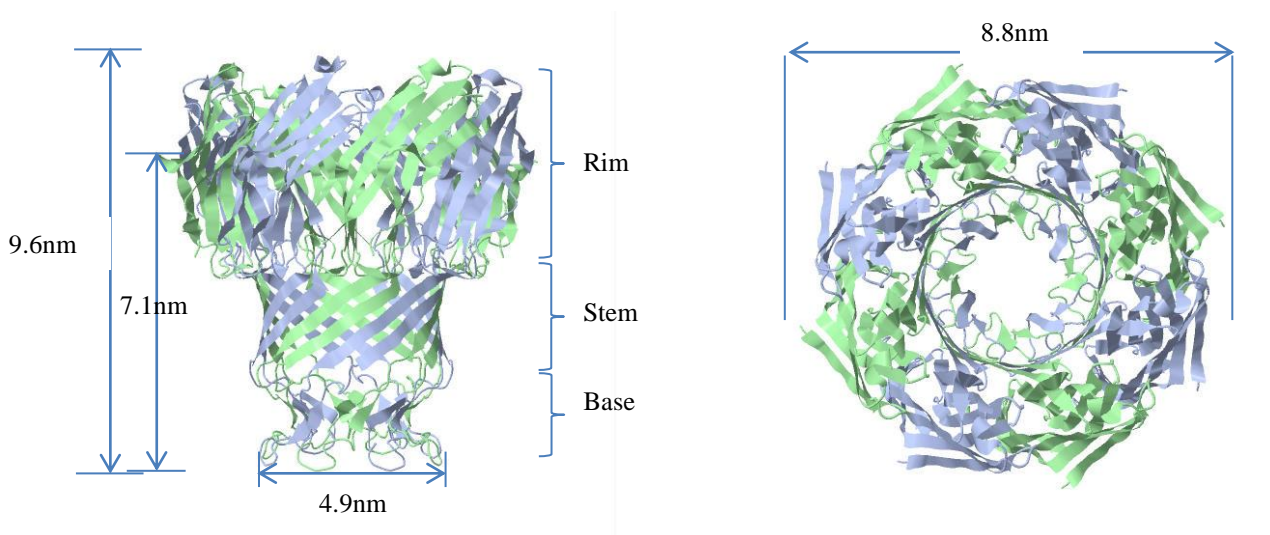
**Tableau 4 :** Les porines chez les mycobactéries

#### III.5.1.1 MspA chez *M. smegmatis*

La protéine MspA est la porine la plus étudiée chez les mycobactéries. C'est la porine majoritaire et principale chez *M. smegmatis*, sa mutation entraîne une diminution par 9 de la perméabilité à la céphaloridine et par 4 pour l'entrée de glucose. C'est la voie générale de diffusion des composés hydrophiles. Trois protéines homologues à MspA ont été identifiées chez *M. smegmatis* MspB, C et D qui ne diffèrent que par 2, 4 et 18 acides aminés (> 90% d'homologie) (Stahl *et al*, 2001).

MspA est une protéine de 20 kDa qui s'oligomérisse afin de former un canal ayant une conductance de 4 nS dans 1 M de KCl. La structure de MspA obtenue par cristallographie aux rayons X montre qu'il s'agit d'un octamère adoptant une forme en gobelet en feuillet  $\beta$  de 10 nm de hauteur avec un canal central dont le diamètre est variable du fait de la présence d'une zone de constriction composée d'acide aspartique créant un anneau de charge négative

(Figure 20) (Faller *et al*, 2004). Cette structure est très différente de celle retrouvée chez les bactéries Gram<sup>-</sup> où la longueur du pore est environ de 5 nm et où chaque monomère forme un pore à lui tout seul. La structure en gobelet de MspA s'adapte bien aux données obtenues en CEMOVIS notamment au niveau de la longueur du canal. En effet, chez MspA, différentes zones sont identifiées selon leur hydrophobicité : la partie la plus hydrophobe consiste en deux feuillettes  $\beta$  consécutifs formant la « base » et le « stem » et une partie plus hydrophile globulaire appelée le « rim ». La partie hydrophobe a une longueur de 3,7 nm or l'épaisseur de la mycomembrane est de 7,1 nm, il a donc été proposé qu'une partie du « rim » serait ancrée dans la mycomembrane malgré son hydrophilie. En effet, l'étude topologique des différents domaines montre que le « rim » peut être divisé en deux sous domaines (un protégé dans la mycomembrane et le deuxième exposé à la surface) séparés par un anneau de tryptophanes (Mahfoud *et al*, 2006).



**Figure 20** : Structure de la porine MspA de *M. smegmatis* A) vue de face ; B) vue de haut (Faller *et al*, 2004)

### III.5.1.2 *OmpA* chez *M. tuberculosis*

Cette protéine a été identifiée par analyse du génome de *M. tuberculosis* car elle présente au niveau de sa partie C-terminale une homologie de 44% avec la protéine OmpA d'*Escherichia coli* (Senaratne *et al*, 1998). Il a été montré que cette porine a un rôle prépondérant dans la survie des bactéries dans les macrophages. En effet, à pH acide, la perméabilité de la membrane vis-à-vis des petites molécules hydrophiles est diminuée du fait notamment de la fermeture de la majorité des canaux OmpA et pour sa survie, la bactérie surexprime la protéine OmpA (Molle *et al*, 2006; Raynaud *et al*, 2002).

De plus, l'analyse de la séquence d'OmpA montre, comme pour MspA, la présence d'une séquence signal permettant sa translocation au niveau de la mycomembrane mais contrairement à MspA, ces 72 acides aminés ne sont pas clivés après l'adressage et sont essentiels à l'activité porine de OmpA (Alahari *et al*, 2007).

### **III.5.2 Porines chez *C. glutamicum* ATCC13032**

Deux classes de porines ont pu être identifiées chez *C. glutamicum* : les porines à activité anion-sélective (PorB et PorC) et les porines à activité cation-sélective (PorA et PorH). L'ensemble de ces protéines ne présente aucune homologie avec les porines des mycobactéries. Elles diffèrent à la fois d'un point de vue séquence et d'un point de vue taille. En effet, contrairement à celles des mycobactéries, ces porines sont des petites protéines de masse moléculaire inférieure à 15 kDa.

#### **III.5.2.1 Porines cations-sélectives**

L'activité cation-sélective de porines chez *C. glutamicum* ATCC13032 est due à la présence de deux petites protéines PorA et PorH. Il est connu depuis peu que ces deux protéines s'oligomérisent afin de former un canal au sein de la mycomembrane dont la conductance est de 2,5 nS dans 1 M de KCl (Barth *et al*, 2010).

- PorA

L'analyse par séquençage d'Edman associée à l'analyse du gène a permis d'établir la séquence de PorA. Il s'agit d'une petite protéine de 4680 Da constituée de 45 acides aminés (Tableau 5). PorA ne présentant pas de séquence signal, sa localisation au niveau de la mycomembrane ne s'effectue pas par un transport *sec*-dépendant.

L'analyse par séquençage d'Edman de PorA a donné, au niveau de la position 15, un dérivé de phénylthiohydantoïne de déhydroalanine au lieu d'un dérivé de sérine (Lichtinger *et al*, 2001). L'obtention de ce dérivé de déhydroalanine révèle la présence éventuelle d'une modification post-traductionnelle au niveau de cette sérine. En effet, dans les conditions basiques du séquençage a lieu une réaction de  $\beta$ -élimination qui clive la liaison entre la sérine et la modification entraînant le départ de la fonction hydroxyle de la sérine et formant ainsi la déhydroalanine.

Le gène *porA* se trouve en opéron avec le gène *porH*, codant pour la deuxième protéine nécessaire à la formation du pore.

- PorH

Il s'agit d'un polypeptide de 57 acides aminés dont la masse est de 6161Da (Hunten *et al*, 2005a) (Tableau 5). De même que pour PorA, cette protéine ne possède pas de séquence signal pour son export dans la mycomembrane.

Dans un premier temps, il avait été défini que PorA avait une activité de 5.5nS tandis que PorH une activité de 2.5nS. Or Barth *et al* ont montré que ces deux protéines avaient une activité en hétérologue de 2.5ns et que la détection d'une activité à 5.5ns était due à la formation de deux canaux simultanément lors des mesures en Black Lipid Membrane (BLM). De plus dans la même étude, il a été montré que les gènes *porA* et *porH* sont co-transcrits et que donc le mutant  $\Delta porA$  à l'origine est en fait un mutant  $\Delta porA-porH$  (Barth *et al*, 2010). L'étude du mutant  $\Delta porA$  a montré une diminution de la perméabilité de la bactérie en particulier vis-à-vis des antibiotiques. L'absence de PorA et PorH est responsable d'une augmentation de la résistance de la bactérie vis-à-vis de certains antibiotiques (Costa-Riu *et al*, 2003a).

La recherche de séquences orthologues de PorA et PorH a permis d'identifier des protéines PorA et PorH d'autres corynebactéries comme chez *C. diphtheriae*, *C. efficiens* et *C. callunae* (Barth *et al*, 2010; Hunten *et al*, 2005b; Schiffler *et al*, 2007).

### **III.5.2.1 Porines anions-sélectives**

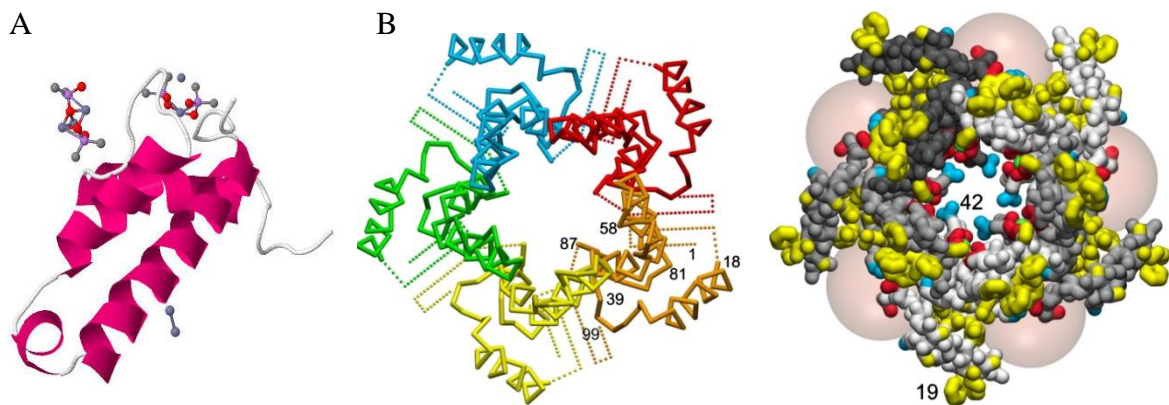
L'analyse en BLM du mutant  $\Delta porA-porH$  permet d'observer la formation de canal avec une conductance de 0,7 nS et une absence de conductance à 2,5 nS et 5,5 nS. Ceci a permis de mettre en évidence la présence de deux porines anions-sélectives : PorB et PorC chez *C. glutamicum* ATCC13032 (Costa-Riu *et al*, 2003b).

La purification d'une fraction active suivie du séquençage d'Edman a permis d'identifier la protéine PorB. Il s'agit d'une protéine de 126 acides aminés contenant du côté N-terminal une séquence signal de 27 acides aminés permettant son export selon le mode *sec*. La protéine mature a une masse de 10,6 kDa.

	Nbre aa	MW	Sélectivité	Gène	pI	Activité dans 1M KCl	Séquence
<b>PorA</b>	45	4680	Cation	<i>porA</i>	3,77	Hétéroooligomère 2,5 nS	MENVYEFGLNLDVLSGSLIGYVFDFLGASSKWAGAVADLIGLLG
<b>PorH</b>	57	6161	Cation	<i>porH</i>	3,47		MDLSLLKETLGNLYETFGGNIGTALQSIPTLLDSILNFFDNFGDLADTTGENLDFSS
<b>PorB</b>	126 (27+99)	10638	Anion	<i>porB</i>	4,2	700 pS	MKLSHRIAAMAATAGITVAAFAAPASASDFANLSSTNKELSPQYNWVACGILEGGLKAAGVLEE GQYNRELAEAIAAKGEGFWTTQFPQIGDWNEQAAAALADRAQTCGLVKADTYLSELSSNFSS
<b>PorC</b>	123	13102	Anion	<i>porC</i>	5,15	nd	MKKLRFATIAAATVALTASLTPSASAQDFNQIIDNFDCGILQTAIYTTGLAHENSTRSELANLRNS AAVQLDFPLNIAATGYSERIANRALTCGIVKEDPQDFLSQLQLLSSNLSSSFFTA

**Tableau 5 :** Les porines chez *C. glutamicum* ATCC13032

Une étude structurale par cristallographie aux rayons X a été effectuée sur la protéine PorB exprimée et purifiée chez *E. coli*. De façon étonnante pour une protéine de membrane externe, PorB est formée de 4 hélices  $\alpha$  (Figure 21A). La structure obtenue ne permet pas de définir un pore en accord avec l'activité porine observée d'où l'hypothèse que PorB s'oligomériserait pour former un canal comme pour la porine MspA. Une modélisation a été effectuée afin d'obtenir la structure d'un canal ; il s'agirait donc d'un pentamère de PorB en hélice  $\alpha$  (Ziegler *et al*, 2008) (Figure 21B).



**Figure 21 :** A) Structure de PorB ; B) modélisation d'un pentamère de PorB

La recherche de gène homologue de *porB* a permis d'identifier un deuxième gène chez *C. glutamicum* ATCC13032 : *porC*. Ce gène se présente en opéron avec *porB* et est donc co-transcrit. Il s'agit d'une protéine de 123 acides aminés possédant 31% d'homologie avec PorB. De même que son homologue, elle possède une séquence signal mais aucune évidence de son expression n'a pu être mise à jour (Costa-Riu *et al*, 2003b). PorB et PorC de même que PorA et PorH sont conservées chez *C. efficiens*.

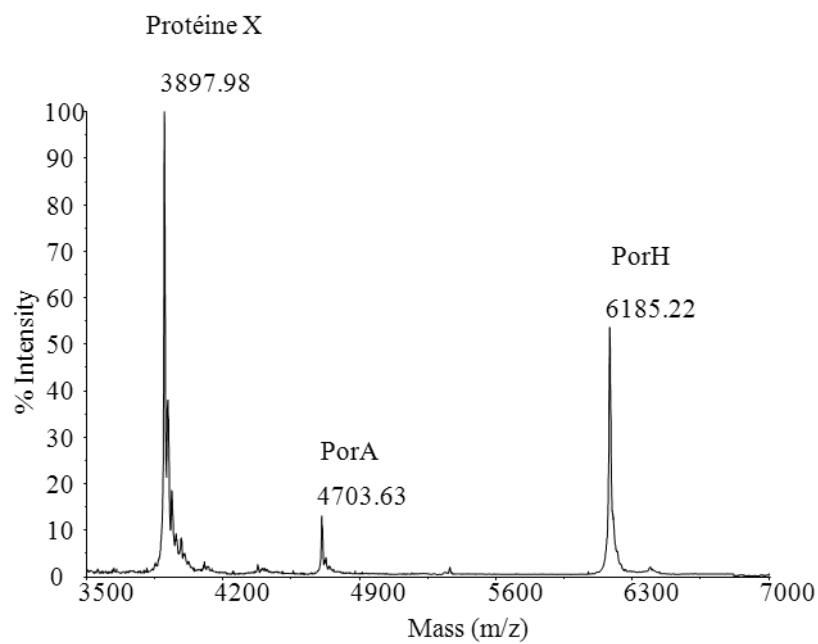
---

## **Chapitre IV    Présentation des travaux**

---

	<b>M + H<sup>+</sup></b>	<b>M + Na<sup>+</sup></b>
<b>PorA</b> MENVYEFGLNLDVLSGSLIGYVDFDLGASSKWAGAVADLIGLLG	4681,39	4703,39
<b>PorH</b> MDLSLLKETLGN YETFGGNIGTALQSIPTLLDSILNFFDNFGDLADTTGENLDFSS	6162,81	6184,81

**Tableau 6 :** Masses théoriques de PorA et PorH sous forme d'adduit H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>



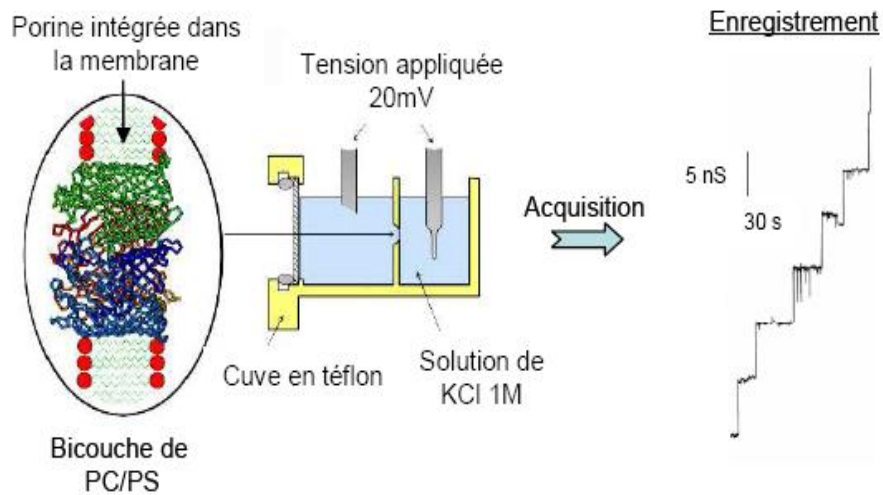
**Figure 22 :** Spectre de masse d'un extrait protéique de *C. glutamicum*  $\Delta Ots\Delta ATreY\Delta TreS$  cultivé en milieu minimum en présence de saccharose, obtenu par MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont des adduits sodium (M + Na<sup>+</sup>).



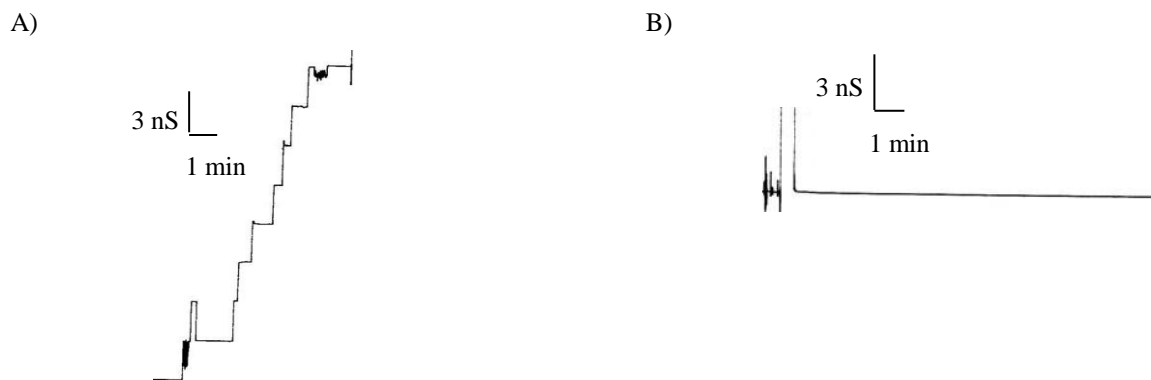
La présence de la mycomembrane chez les *Corynebacterineae* est responsable de la faible perméabilité de l'enveloppe, empêchant ainsi la diffusion passive des composés hydrophiles. Pour leur survie, les *Corynebacterineae* ont mis en place des protéines à activité porine facilitant le passage des solutés hydrophiles à travers cette deuxième membrane composée en particulier d'acides mycoliques.

Une étude des porines chez *C. glutamicum* a été initiée dans le but de regarder le devenir de certaines protéines pariétales en absence de mycomembrane et d'évaluer l'impact de l'absence d'acide mycolique sur la présence et l'activité des porines. Chez *C. glutamicum*, il existe différents mutants de la biosynthèse des acides mycoliques comme  $\Delta pks13::km$  (Portevin *et al*, 2004),  $\Delta fadD32::km$  et  $\Delta accD4::km$  (Portevin *et al*, 2005) ou bien des voies de biosynthèse du tréhalose, accepteur final et essentiel à la biosynthèse des acides mycoliques (mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$ ) (Tropis *et al*, 2005b). Dans un premier temps, l'analyse de la présence des porines a été effectuée dans le mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$ . Il a été démontré dans l'équipe que ce mutant cultivé sur milieu synthétique en présence de saccharose, ne synthétise plus d'acides mycoliques. Des expériences de microscopie électronique par cryofracture sur ce mutant montrent un seul plan de fracture au niveau de la membrane plasmique, en accord avec l'absence d'acides mycoliques contrairement à la souche sauvage qui présente un deuxième plan de fracture au niveau de la mycomembrane. L'addition de tréhalose dans le milieu de culture permet de réinitier la biosynthèse des acides mycoliques dans le mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  et donc de former à nouveau la mycomembrane, visible par cryofracture (Tropis *et al*, 2005b).

Les travaux sur les porines initiés par X. Méniche ont montré que le mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé en présence de saccharose exprime les porines PorA et PorH décrites chez *C. glutamicum* ATCC13032 malgré l'absence de mycomembrane. En effet, l'analyse d'extrait protéique en spectrométrie de masse Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF) permet de visualiser les protéines PorA et PorH à la masse théorique respectivement sous forme d'adduits sodium  $[M + Na]^+ = 4703\text{Da}$  et  $6184\text{Da}$  (Tableau 6, Figure 22). L'expression des porines est donc indépendante de la présence de membrane externe chez *C. glutamicum* ATCC13032. La question qui s'est posée par la suite était de savoir si les porines exprimées dans des souches dépourvus de mycomembrane conservaient leur activité.



**Figure 23 :** Schéma du dispositif de mesure de l'activité porine en bicouche lipidique plane (BLM)



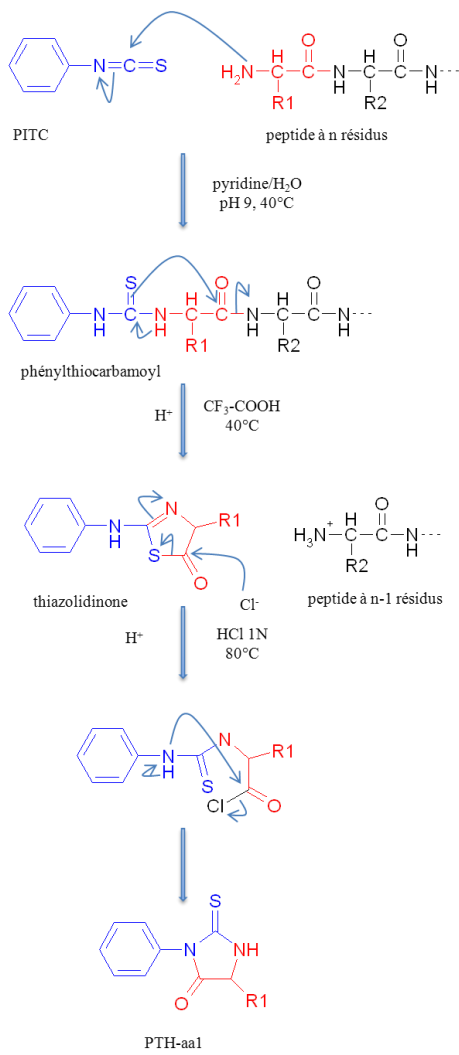
**Figure 24 :** Etude de l'activité porine de l'hétérooligomère PorA-PorH en BLM dans des membranes de PC/PS/n-decane. A) Extrait protéique de *C. glutamicum* ATCC13032 ou  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  en présence de tréhalose ; B) Extrait protéique de *C. glutamicum*  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  sans tréhalose.

La mesure d'activité des porines s'effectue par la méthode de « black lipid membrane » (BLM) qui consiste à mesurer la conductance entre deux cuves séparées par une bicouche lipidique constituée généralement de diphytanoyl phosphatidylcholine et de diphytanoyl phosphatidylsérine. La formation d'un canal protéique à travers cette bicouche va permettre le passage d'ions d'une cuve à l'autre entraînant ainsi une augmentation de la conductance (Figure 23).

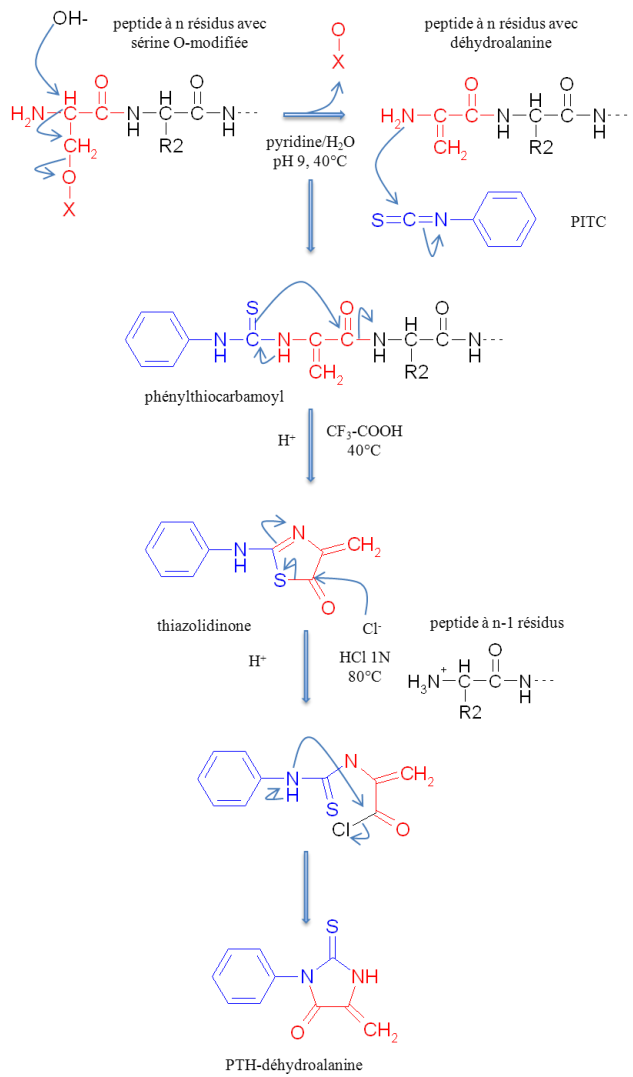
Les premières études en BLM menées sur les protéines purifiées PorA et PorH indiquaient qu'il s'agit de protéines indépendantes ayant chacune une activité porine cation sélective (Costa-Riu *et al*, 2003a; Hunten *et al*, 2005a; Lichtinger *et al*, 1998; Lichtinger *et al*, 2001). Or, des résultats récents de la même équipe montrent qu'en fait ces deux protéines sont co-traduites et co-purifiées. Les analyses précédentes avaient donc toujours été effectuées sur le mélange des deux protéines. Afin de pallier ces difficultés, les auteurs ont exprimé les protéines PorA et PorH avec une étiquette histidine afin de les purifier séparément. L'activité des protéines recombinantes a été mesurée par des expériences de BLM. Ceci a permis de montrer que l'activité cation sélective de 2,5 nS enregistrée lors des précédentes études est caractéristique de l'hétéroooligomère PorA-PorH et non des deux protéines séparées (Barth *et al*, 2010). Une étude d'activité des porines a été réalisée, au sein de l'équipe, à partir d'extraits organiques issus de *C. glutamicum* Res167, souche qui dérive de la souche ATCC13032, du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé sur saccharose et du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé en présence de tréhalose afin d'évaluer l'impact de la présence de la mycomembrane sur l'activité porine de PorA-PorH. La mesure d'activité de l'extrait organique de la souche sauvage permet l'enregistrement de la conductance de référence de 2,5 nS identique à celle publiée. Par contre, l'analyse de l'extrait organique du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  sur milieu minimum saccharose et donc dépourvu de mycomembrane, ne montre aucune conductance en BLM ce qui indique que la présence d'acides mycoliques est indispensable à l'activité porine de PorA-PorH. *A contrario*, la souche  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivée sur milieu minimum saccharose en présence de tréhalose présente une activité comparable à celle de la souche sauvage due à la restauration de la mycomembrane (Figure 24).

***L'ensemble de ces résultats montre que l'activité porine de l'hétéroooligomère PorA-PorH est dépendante de la présence d'acides mycoliques.***

A)



B)



**Figure 25 :** A) Mécanisme de la dégradation d'Edman B) Réaction de  $\beta$ -élimination sur la sérine 15 de PorA dans les conditions du séquençage d'Edman entraînant la formation d'une phénylthiohydantoïne de déhydroalanine.

Lors de l'identification de PorA par séquençage d'Edman (Figure 25), Lichtinger *et al* ont mis en évidence la libération d'un dérivé de phénylthiohydantoïne de déhydroalanine à la position 15 à la place d'un dérivé de phénylthiohydantoïne de sérine comme attendu à partir de l'analyse du génome (Lichtinger *et al*, 2001). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la sérine 15 était modifiée post-traductionnellement. En effet, la première étape de la dégradation d'Edman se réalise à pH basique afin de permettre le couplage de la fonction amine terminale avec le réactif d'Edman, le phénylisothiocyanate (PITC) (Figure 25A). Les conditions basiques de cette étape entraînent une réaction de  $\beta$ -élimination de la modification post-traductionnelle au niveau de la sérine modifiée et, dans le cas présent, la formation de la déhydroalanine (Figure 25B).

La mise en relation entre les données obtenues sur les mutants dépourvus d'acides mycoliques et la présence potentielle d'une modification post-traductionnelle sur PorA a permis d'émettre l'hypothèse que cette modification était nécessaire à l'activité et était dépendante de la présence d'acides mycoliques.

Mon travail de thèse a consisté à identifier et à caractériser cette modification post-traductionnelle. Cette étude a permis de montrer qu'il existe au moins trois protéines de petite taille chez *C. glutamicum* ATCC13032 portant cette modification : PorA, PorH et une protéine inconnue au début de l'étude appelée protéine X.

La première partie sera consacrée à l'identification et à la caractérisation biochimique de la modification post-traductionnelle sur PorA, PorH et sur la protéine X par différentes méthodes (spectrométrie de masse, chromatographie en phase gazeuse, dégradations chimiques contrôlées, mutagenèse...) ainsi qu'à l'importance de cette modification en termes d'activité porine du complexe PorA-PorH par des expériences de BLM.

La deuxième partie décrira la démarche ayant permis l'identification de la protéine X jusqu'alors inconnue.

La troisième partie concerne la recherche de l'enzyme impliquée dans le transfert des acides mycoliques sur ces protéines et sa caractérisation.

Enfin dans une dernière partie, nous avons souhaité savoir si ce type de modification est un phénomène spécifique du genre *Corynebacterium* voire de certaines corynébactéries ou bien s'il s'agit d'une modification générale au sous-ordre des *Corynebacterineae*.

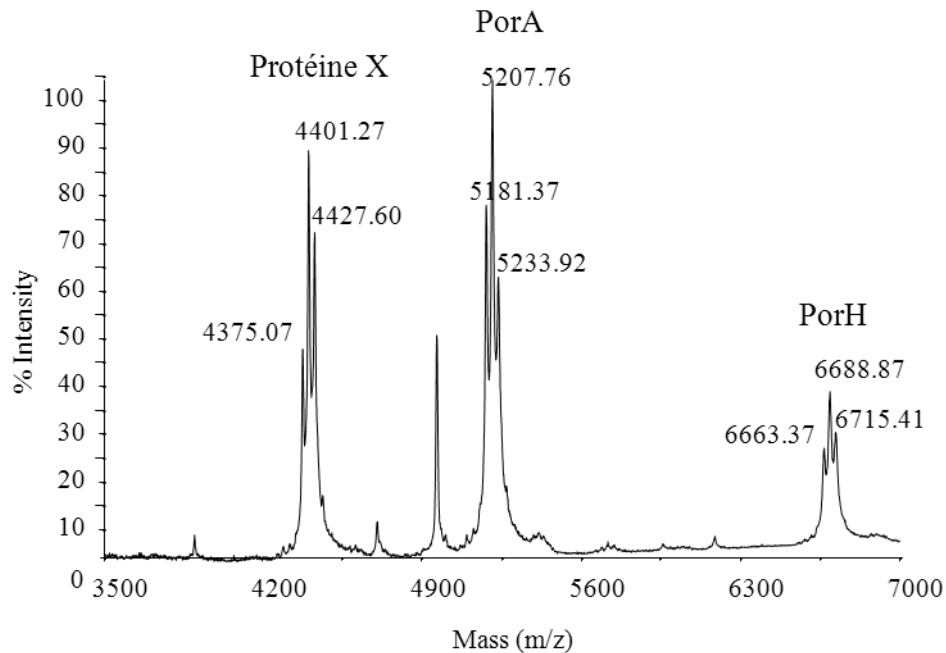
## Chapitre V *O*-mycoloylation : nouvelle modification post-traductionnelle

### V.1 Identification et caractérisation biochimique de la modification

La technique de choix pour identifier une modification post-traductionnelle est la spectrométrie de masse. En effet, la présence d'une modification post-traductionnelle sur une protéine entraîne un incrément de masse spécifique. L'analyse d'une protéine à l'état natif c'est-à-dire sans digestion enzymatique est délicate du fait de la perte de sensibilité des appareils pour des hautes masses. Dans ce cas, la méthodologie la plus appropriée est l'analyse par MALDI-TOF. Cette technique consiste à ioniser à l'aide d'un laser l'échantillon co-cristallisé avec une matrice. L'analyseur couplé à la source MALDI est un analyseur à temps de vol (TOF) dont la gamme de masse est, en théorie, illimitée. Cet analyseur peut être utilisé selon deux modes de fonctionnement : mode linéaire et mode réflectron. Le mode linéaire permet l'analyse des macromolécules de très haute masse mais avec une perte de résolution tandis que le mode réflectron permet d'avoir une bonne résolution mais avec une perte de sensibilité en particulier pour des masses supérieures à 20 kDa. En général, en mode positif, toutes les masses observées correspondent à la masse de la macromolécule sous forme d'adduit proton  $[M+H]^+$  ou d'adduit sodium  $[M+Na]^+$ . Des tentatives dans les modes de détection linéaire et réflectron ont été effectuées pour identifier la modification post-traductionnelle sur les protéines PorA et PorH, mais seul le mode de détection linéaire positif nous a permis d'obtenir des spectres exploitables. PorA et PorH sont des petites protéines qui s'extraient facilement comme les lipides avec des solvants organiques (chloroforme/méthanol 1:2). Le MALDI-TOF est une des techniques compatible avec les solvants organiques tels que le chloroforme et le méthanol car les solvants sont évaporés avant l'analyse. De plus, l'analyse de ces protéines en solvant organique permet de limiter la perte de sensibilité due aux solutions tampons et aux sels. En effet, dans un premier temps, toutes les analyses en spectrométrie de masse étaient effectuées après précipitation de l'extrait chloroforme/méthanol à l'éther et resolubilisation dans une solution tampon en présence de détergent mais la désorption des différents composés était variable et de qualité moyenne avec un rapport signal sur bruit faible. L'analyse directe de l'extrait en solvant organique sans l'étape de précipitation a permis d'avoir des signaux de meilleure qualité et reproductibles. Par la suite, l'extrait organique analysé par MALDI-TOF sera appelé extrait protéique.

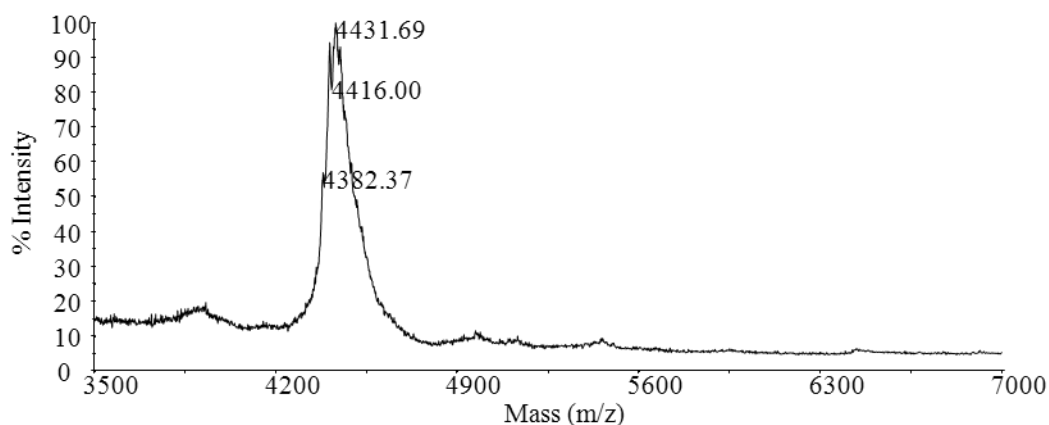
### V.1.1 Identification de la modification post-traductionnelle par spectrométrie de masse

Les premières analyses d'un extrait protéique de *C. glutamicum* Res167 dans une gamme de masses de  $m/z$  de 3000 et 7000 montrent trois zones importantes de pics centrées sur  $m/z$  4401, 5207 et 6688 (Figure 26). Mais aucune de ces masses ne correspond à la masse théorique de PorA et PorH qui sont respectivement de 4680 Da et 6161 Da (Tableau 6).



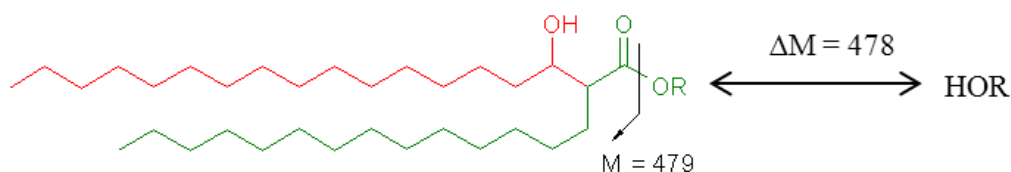
**Figure 26 :** Spectre de masse d'un extrait protéique de *C. glutamicum* ATCC13032 obtenu par MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont des adduits sodium  $[M+Na]^+$ .

Afin de voir si certaines de ces masses sont liées à la présence de PorA et PorH éventuellement modifiées, nous avons procédé à l'analyse MALDI-TOF de l'extrait protéique du double mutant  $\Delta PorA-PorH$  (collaboration Pr R. Benz). Le spectre montre uniquement la présence du pic centré sur  $m/z$  4431, les pics centrés sur  $m/z$  5207 et  $m/z$  6688 sont absents. Ce mutant n'exprimant plus les protéines d'intérêt PorA et PorH (Tableau 6), nous en avons déduit que les pics à  $m/z$  5207 et  $m/z$  6688 pouvaient être attribués à la présence de PorA et de PorH avec un incrément de masse (Figure 27). Le pic centré sur  $m/z$  4401 correspond quant à lui à une protéine non décrite indépendante de PorA et PorH que l'on appellera par la suite Protéine X et dont on détaillera l'analyse dans la partie Chapitre VI (p73).



**Figure 27 :** Spectre de masse d'un extrait protéique du double mutant  $\Delta PorA-PorH$  obtenu en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont des adduits sodium  $[M+Na]^+$

A)



B)

Acide corynomycolique	Acide gras	Acide gras	Masse Moléculaire du résidu mycoloylé
C32 :0	C16 :0	C16 :0	479
C34 :1	C16 :0	C18 :1	505
C36 :2	C18 :1	C18 :1	531

**Figure 28 :** A) Structure du résidu corynomycolate C32:0 lié à la protéine (R) entraînant un incrément de masse de la protéine de 478 uma. B) Tableau récapitulatif des acides corynomycoliques issus de la condensation de deux acides gras présents chez *C. glutamicum* ATCC13032 et masse de chaque résidu correspondant.

La comparaison entre les masses prédites pour PorA et PorH et les masses obtenues par l'analyse MALDI-TOF conforte l'hypothèse d'une modification post-traductionnelle sur ces protéines. En effet, l'incrément de masse pour chaque protéine est de 504 par rapport au pic central ( $m/z = 5207$  pour PorA et  $m/z = 6688$  pour PorH). De plus, l'observation de l'allure des trois massifs montre une hétérogénéité, avec pour chaque massif des pics distants de  $m/z = 26$ . De façon intéressante, ces incréments de masses (478, 504, 530) peuvent correspondre à la



différence entre la masse de la protéine avec ou sans acide mycolique (Figure 28A). En effet, *C. glutamicum* produit essentiellement des corynomycolates en C32:0, C34:1, C36:2 qui résultent de la condensation de 2 acides gras en C16:0, C18:0 ou C18:1 par l'enzyme Pks13 dont les masses sont regroupées dans la Figure 28B.

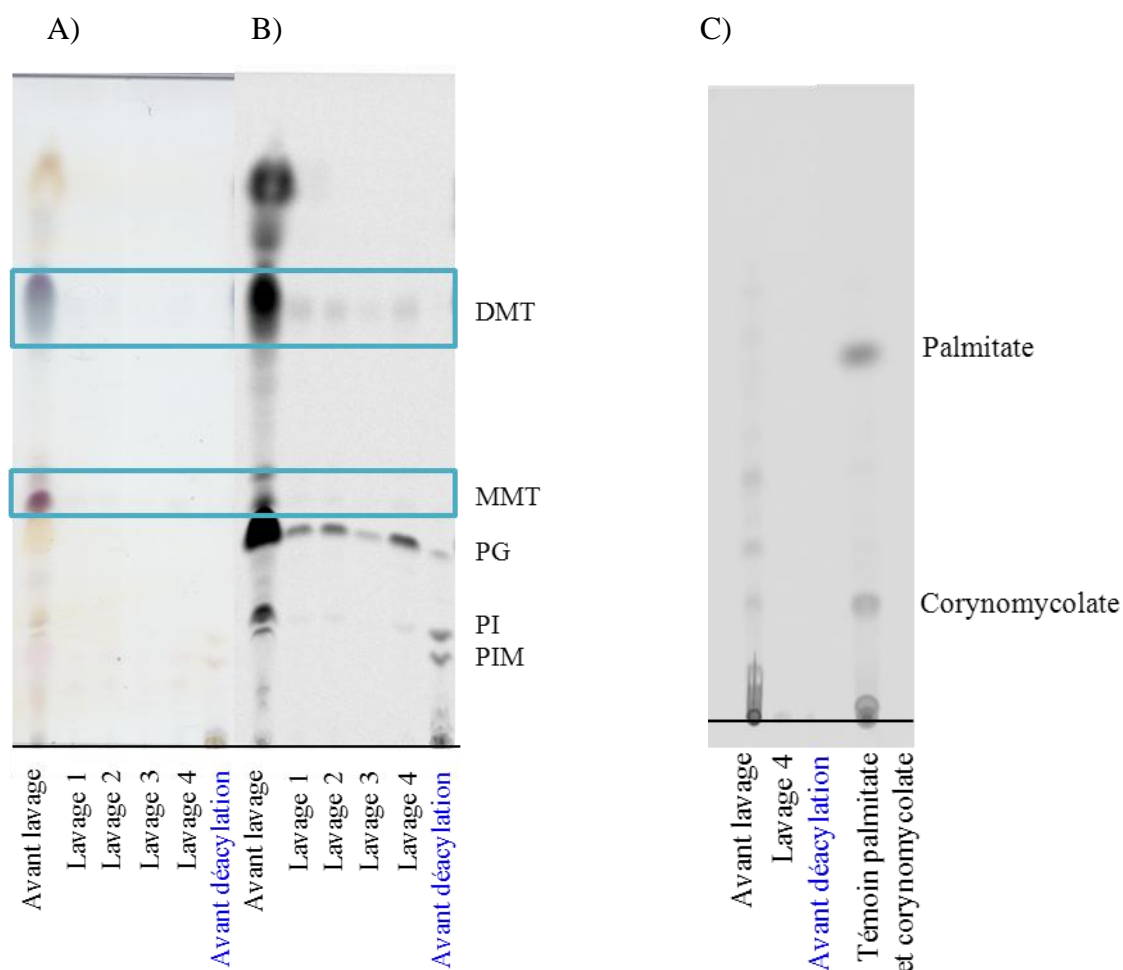
***Les protéines PorA et PorH pourraient donc être modifiées par un acide corynomycolique.***

### **V.1.2 Caractérisation de la mycoloylation par traitement alcalin**

Sachant que le séquençage d'Edman sur PorA montre que la sérine en position 15 serait modifiée, nous avons pensé à une O-acylation. Si la liaison entre la sérine et l'acide corynomycolique est de type ester, cette liaison doit être clivable en milieu alcalin.

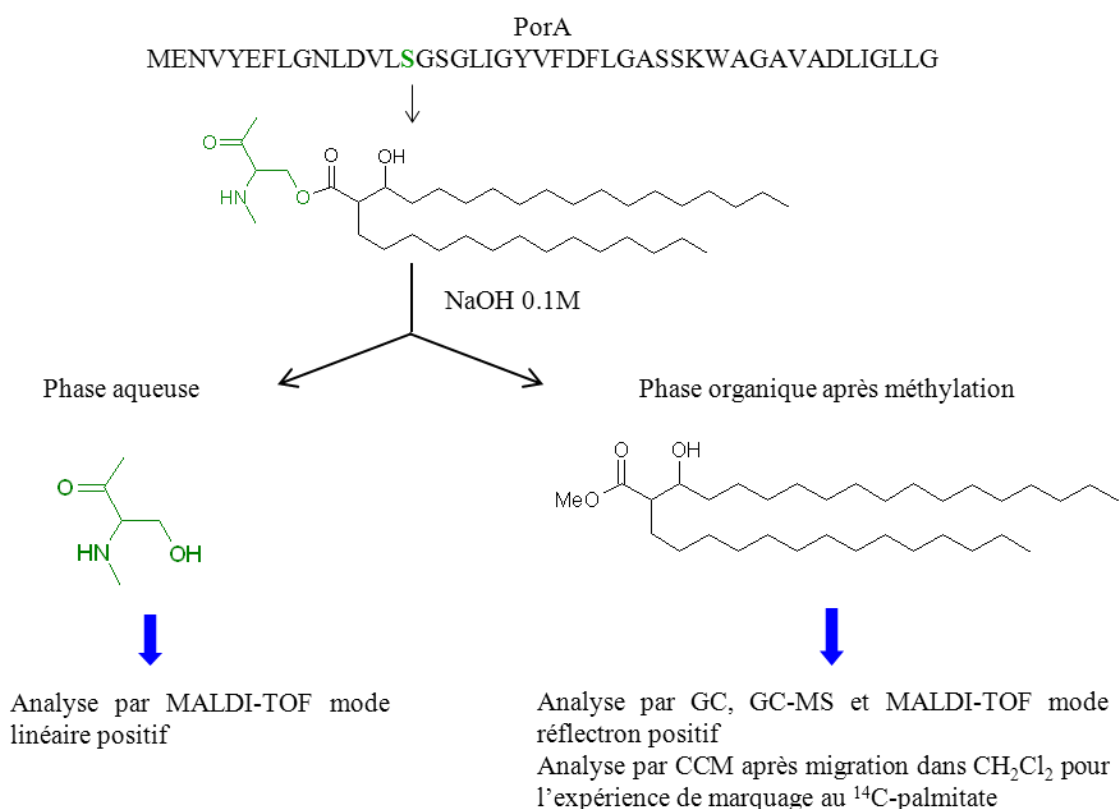
Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une déacylation alcaline sur un extrait protéique. Pour cela, un échantillon enrichi en protéines a été préparé par la méthode couramment utilisée : précipitation dans l'éther diéthylique de l'extrait organique chloroforme/méthanol. Après centrifugation, le culot enrichi en protéines est resuspendu dans de l'eau acidifiée à pH = 3-4 pour libérer les acides mycoliques libres et non sous forme de sels (non extractibles en solvants organiques). Sur cet échantillon, nous avons effectué différents lavages avec du chloroforme (lavage 1 et 2) et de l'éther diéthylique (lavage 3 et 4) afin d'éliminer tous les composés à acides mycoliques (acides mycoliques libres, MMT, DMT ...) qui sont également présents dans l'extrait chloroforme/méthanol. L'absence de composés à acides mycoliques est vérifiée par analyse par CCM dans les solvants chloroforme/méthanol/eau (65 :25 :4, v/v/v) pour le MMT et DMT suivie d'une révélation des sucres à l'antrone, et dans le dichlorométhane pour les acides mycoliques libres méthylés après révélation des chaînes acyles à la rhodamine.

Afin d'avoir une meilleure sensibilité et de valider l'intérêt de ces différents lavages, nous avons effectué la même expérience après un marquage métabolique au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate. Ceci permet de marquer l'ensemble des lipides et en particulier les acides mycoliques. Dans ce cas, la révélation des différentes couches minces se fait par autoradiographie. Nous observons, après les différents lavages, l'absence de composés correspondant au MMT et DMT après migration dans les solvants chloroforme/méthanol/eau (65 :25 :4, v/v/v) (Figure 29A et B) et l'absence d'ester de méthyle d'acide corynomycolique après migration dans du dichlorométhane (Figure 29C). Cette vérification est nécessaire afin de s'assurer que les acides mycoliques potentiellement libérés après déacylation sont uniquement issus des protéines : PorA, PorH et la protéine X.



**Figure 29 :** Analyse par CCM des différentes phases obtenues après lavages au chloroforme (lavage 1 et 2) et à l'éther diéthylique (lavage 3 et 4) et de la phase aqueuse avant la déacylation après marquage métabolique des lipides au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate. A) CCM en chloroforme/méthanol/eau 65:25:4 (v/v/v) révélée à l'anthrone ; B) Autoradiographie de la CCM en chloroforme/méthanol/eau 65:25:4 (v/v/v) ; C) Autoradiographie de la CCM en dichlorométhane 100%.

Le traitement alcalin (NaOH 0.1 M, 30 minutes, température ambiante) est alors effectué sur l'extrait protéique. Après l'arrêt de la réaction avec de l'acide sulfurique, les éventuels acides corynomycoliques libérés par le traitement sont extraits à l'éther diéthylique puis méthylés afin d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée ou non à la spectrométrie de masse (GC-MS), en MALDI-TOF et par CCM en dichlorométhane lors du marquage au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate. La phase aqueuse contenant les protéines est dialysée dans le but d'éliminer les sels présents en solution et, qui à forte concentration, sont incompatibles avec l'analyse par MALDI-TOF (Figure 30).



**Figure 30 :** Déacylation alcaline des protéines *O*-acylées, illustration des résultats attendus pour la protéine PorA.

### **V.1.2.1 Analyse de la phase aqueuse**

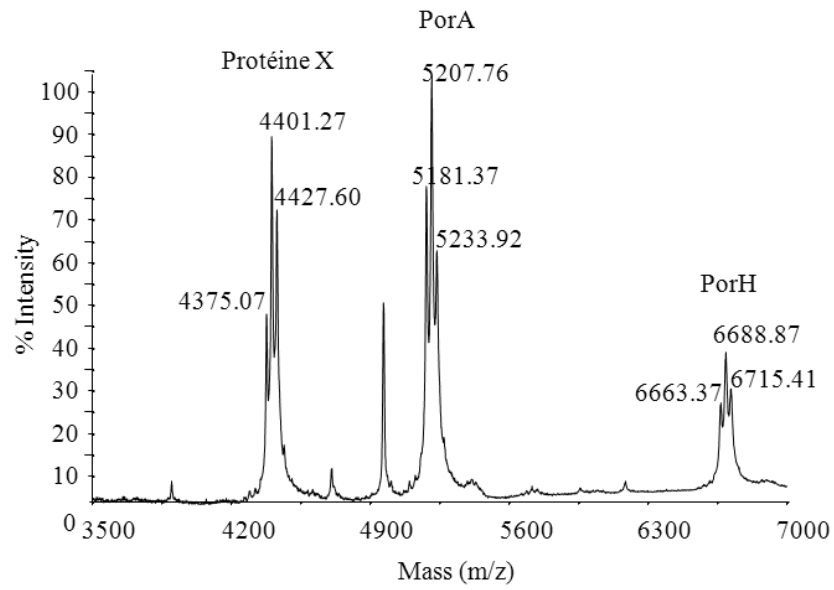
L'analyse de la phase aqueuse après dialyse par MALDI-TOF montre la présence de trois pics de  $m/z = 3897, 4703, 6184$  (Figure 31B). Il y a donc un déplacement des pics suite au traitement alcalin de PorA et PorH présents initialement à  $m/z = 5207$  et  $6688$  (Figure 31B) vers, respectivement,  $m/z = 4703$  et  $6184$  correspondant bien aux masses théoriques de PorA et PorH (Figure 31B ; Tableau 6).

On note également pour la protéine X un déplacement de la masse de  $m/z = 4401$  vers  $m/z = 3897$  avec des différences de masse de 478, 504 et 530 Da comme pour PorA et PorH. La protéine X pourrait donc être une nouvelle protéine modifiée de la même façon que PorA et PorH.

La perte de la modification post-traductionnelle entraîne aussi un changement de l'allure des pics, qui ne sont plus hétérogènes et un seul pic est obtenu par protéine ( $m/z = 3897, 4703, 6184$ ) (Figure 31). Ceci est en accord avec une acylation par le mélange d'acides mycoliques synthétisés par la souche *C. glutamicum* ATCC13032.

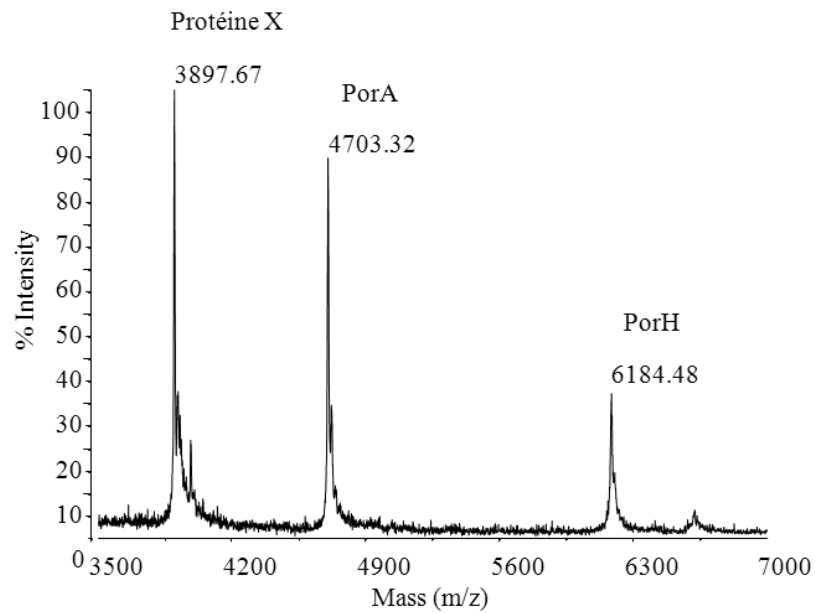
***Le traitement alcalin nous a permis de mettre en évidence une liaison de type ester entre la protéine et la modification post-traductionnelle.***

A)



↓ Déacylation alcaline

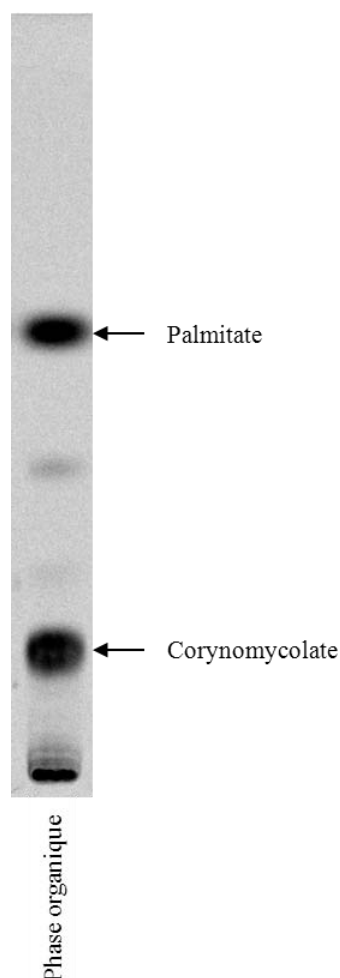
B)



**Figure 31 :** A) Spectre de masse de l'extrait protéique avant déacylation alcaline B) Spectre de masse de la phase aqueuse après traitement alcalin et dialyse. Les spectres sont obtenus par MALDI-TOF en mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

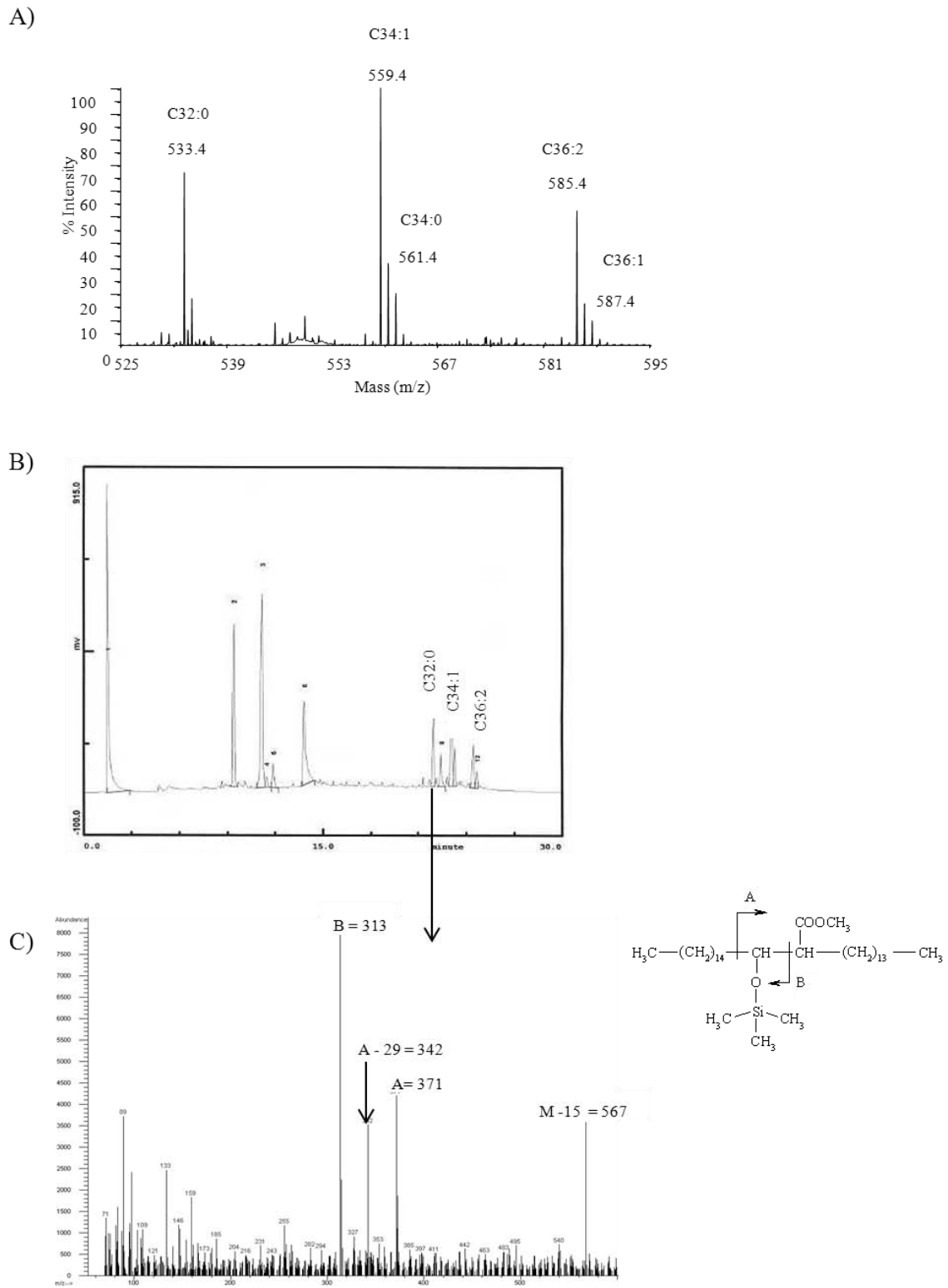
### V.1.2.2 Analyse de la phase organique

La phase organique obtenue après le traitement alcalin de l'extrait protéique a été, dans un premier temps, méthylée et analysée par CCM pour l'expérience de marquage métabolique, et par MALDI-TOF pour l'expérience sans marquage. L'extrait lipidique issu du marquage métabolique au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate, analysée par CCM après migration dans le dichlorométhane, montre la libération de corynomycolate de méthyle (Figure 32).



**Figure 32 :** CCM des esters de méthyle obtenus après le traitement alcalin de l'extrait protéique issu du marquage au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate (solvant : dichlorométhane 100% suivie d'une autoradiographie).

L'analyse par MALDI-TOF confirme la présence de corynomycolates de méthyles. Sur le spectre de masse obtenu en mode réflectron positif, nous observons les pics correspondant aux corynomycolates principaux chez *C. glutamicum* C32:0 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 533$ ), C34:1 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 559$ ) et C34:0 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 561$ ), C36:2 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 585$ ) et C36:1 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 587$ ) (Figure 33A).



**Figure 33 :** Etude des acides corynomycoliques liés aux protéines PorA, PorH et la protéine X A) Spectre MALDI-TOF mode réflectron positif des corynomycolates de méthyle ; tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+\text{Na}]^+$ , B) Profil GC des esters de méthyle de *C. glutamicum* après silylation C) Spectre d'impact électronique de l'homologue C32:0 correspondant à la masse M-15, les fragments A et B permettent de déduire les longueurs de chaîne.

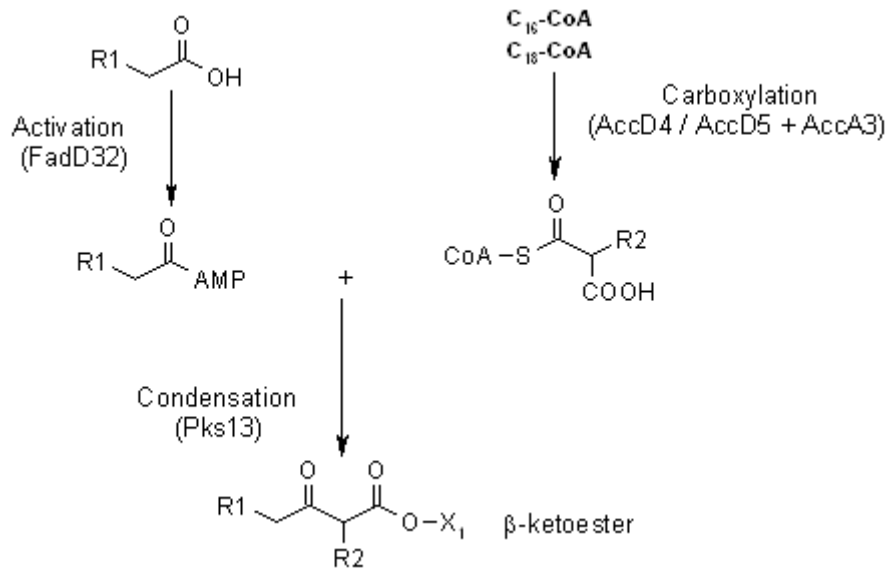
La présence d'acides gras ayant le rapport frontal et la masse moléculaire des acides corynomycoliques témoins de *C. glutamicum* nous a conduit à effectuer un traitement chimique par les réactifs de silylation en vue de confirmer leur structure en chromatographie en phase gazeuse (GC) et en GC couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le chromatogramme obtenu montre la présence de pics ayant le même temps de rétention que les corynomycolates de méthyle triméthylsilylés témoins de *C. glutamicum* ATCC13032 (Figure 33B). Les analyses en GC-MS ont permis d'identifier les espèces moléculaires par leurs pics pseudomoléculaires (M-15 départ d'un méthyle du groupement triméthylsilyle) à  $m/z$  567 (C32:0), 593 (C34:1), 619 (C36:2) pour les principaux homologues. Les fragments obtenus par impact électronique permettent de connaître le contenu de chaque homologue : un exemple est donné pour le C32:0 dans la Figure 33C. Le fragment B à  $m/z$  313 correspond à la chaîne en C16 issue de la coupure après le C $\beta$  libérant l'aldéhyde B chargé. Le fragment A à  $m/z$  371 correspond à l'ester chargé issu de la coupure au niveau de la liaison C $\alpha$ -C $\beta$  (Figure 33C) (Nishiuchi *et al*, 1999; Nishiuchi *et al*, 2000).

***Le traitement alcalin a permis de démontrer de façon formelle la modification de trois protéines (PorA, PorH et la protéine X) par un acide corynomycolique chez C. glutamicum. Il s'agit donc d'une O-acylation particulière que nous avons appelé O-mycoloylation.***

### **V.1.3 Confirmation de la mycoloylation de PorA, PorH, et la protéine X à l'aide de mutants des voies de biosynthèse des acides mycoliques**

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer l'existence de protéines mycoloylées à l'aide de différents mutants de biosynthèse des acides mycoliques. Les souches de *C. glutamicum*  $\Delta pks13::km$ ,  $\Delta fadD32::km$  et  $\Delta accD4::km$  dont nous disposons au laboratoire sont incapables de produire des acides mycoliques du fait de la mutation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la condensation. En effet, Pks13 est l'enzyme responsable de la condensation des deux acides gras activés formant l'acide corynomycolique (Figure 34) (Portevin *et al*, 2004). FadD32 et AccD4 sont les enzymes impliquées dans l'activation des deux acides gras, substrats de la réaction de condensation. FadD32 est l'acyl-AMP ligase permettant d'activer un des deux acides gras sous forme d'acyl-AMP (Portevin *et al*, 2005) et AccD4 est une acyl-CoA carboxylase nécessaire à la formation de l'acyl-carboxy-CoA correspondant au deuxième acide gras activé pris en charge par Pks13 pour former le  $\beta$ -cétoster précurseur de l'acide mycolique (Portevin *et al*, 2005).





**Figure 34 :** Biosynthèse de l'acide corynomycolique à partir de deux molécules d'acide gras

La mutation  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  concerne les trois voies de biosynthèse du tréhalose, accepteur final des acides mycoliques, ce qui rétroinhibe la synthèse des acides mycoliques. La biosynthèse des acides mycoliques dans cette souche est donc dépendante des conditions de culture et la synthèse de ces derniers n'est possible qu'en ajoutant du tréhalose exogène dans le milieu.

L'analyse d'extraits protéiques des souches  $\Delta pks13::km$ ,  $\Delta fadD32::km$ ,  $\Delta accD4::km$  ou  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé sur saccharose, montre en MALDI-TOF uniquement la présence des pics à  $m/z$  3897, 4703 et 6184 correspondant aux protéines PorA, PorH, et la protéine X sans acide mycolique. Le spectre est identique à celui obtenu après déacylation alcaline (Figure 31B). Pour la souche  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivée en présence de tréhalose, les trois protéines désorbent respectivement aux masses centrées sur  $m/z$  4401, 5207 et 6688 comme pour la souche sauvage avec à nouveau une allure des massifs caractéristique des résidus acylés avec un  $\Delta m/z = 26$  entre deux homologues. L'ajout de tréhalose, en restaurant la biosynthèse des acides mycoliques, permet de retrouver la modification post-traductionnelle sur les trois protéines.

***L'étude de mutants dépourvus d'acides mycoliques permet de confirmer la présence d'un acide corynomycolique en tant que modification post-traductionnelle sur les protéines PorA, PorH et sur la protéine X.***

#### **V.1.4 Localisation de la modification post-traductionnelle**

L'identification de PorA par séquençage d'Edman permettait de prédire une modification post-traductionnelle sur la sérine 15 puisque les auteurs ont identifié un dérivé de phénylthiohydantoïne de déhydroalanine (Lichtinger *et al*, 2001). Ceci nous a guidés directement vers la position de cette O-mycoloylation sur cet acide aminé. Dans le cas de PorH, les auteurs indiquent que la dégradation d'Edman n'a permis d'identifier que les treize premiers acides aminés mais n'évoquent pas la libération d'un dérivé phénylthiohydantoïne caractéristique d'une modification post-traductionnelle. Afin de confirmer la localisation de la modification sur PorA et de déterminer la localisation sur PorH, différentes techniques ont été mises en œuvre : spectrométrie de masse MS-MS et mutagénèse.

##### ***V.1.4.1 Localisation par MS-MS***

Nos premiers efforts ont été centrés sur une étude par spectrométrie de masse MS-MS en collaboration avec la plateforme protéomique de l'IPBS. Cette technique permet d'avoir accès à la masse des peptides et également de remonter à leur séquence en acides aminés. L'appareil possède au moins deux analyseurs successifs séparés par une cellule de collision. Le premier analyseur permet d'avoir la masse du peptide entier et de sélectionner l'ion parent qui, une fois dans la cellule de collision, va être fragmenté. Les ions fils sont analysés dans le deuxième analyseur afin d'en connaître leur masse. Les fragmentations prépondérantes ont lieu au niveau des liaisons peptidiques permettant ainsi de libérer des ions fils dont la différence de masse correspond à la masse des résidus d'acides aminés. Par conséquent, la présence d'une modification post-traductionnelle sur un acide aminé va entraîner une différence de masse équivalente à la masse du résidu additionnée de la masse de la modification. Cette méthode a été utilisée récemment pour l'étude d'un peptide, la ghréline qui stimule la sécrétion de l'hormone de croissance. Nous avons appliqué la méthode utilisée pour la ghréline car il s'agit d'un peptide de 28 acides aminés acylé par un acide octanoïque sur la sérine en position 3 (Gutierrez *et al*, 2008; Kojima *et al*, 1999) .

L'analyse en MS-MS d'un extrait protéique obtenu après extraction en chloroforme/méthanol, précipitation à l'éther diéthylique puis resolubilisation dans une solution tampon a été effectuée dans différentes conditions : avec ou sans digestion par des enzymes protéolytiques, dans différents tampons, après chromatographie sur phase inverse avec différents gradients d'élution... Aucune des méthodes testées n'a permis d'obtenir des spectres exploitables ni pour PorA, ni pour PorH. L'explication la plus vraisemblable pour expliquer ces résultats

négatifs est qu'il s'agit de protéines très hydrophobes et que le passage sur colonne C18 réalisé systématiquement avant l'injection dans le spectromètre de masse devait retenir la majorité des protéines malgré une adaptation du gradient d'éluion.

#### **V.1.4.2 Localisation par mutagenèse dirigée sur *PorA***

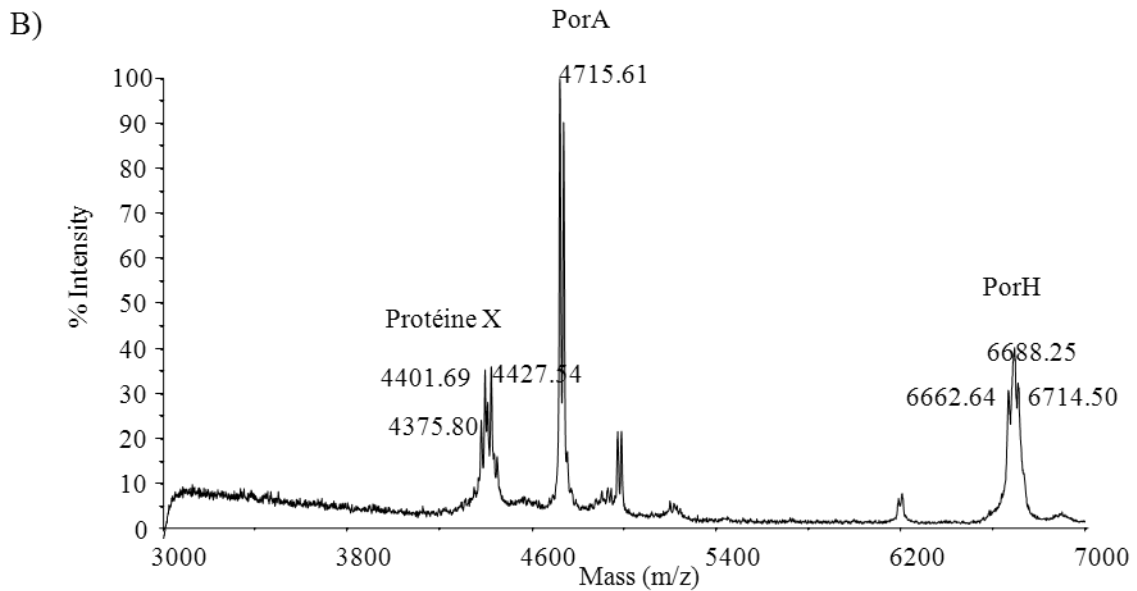
Devant l'impossibilité d'accéder à la séquence par spectrométrie de masse, nous nous sommes alors tournés vers une approche biotechnologique en collaboration avec l'équipe du Pr. N. Bayan (IBBMC, Université Paris-Sud11-Orsay). Il s'agit d'effectuer une mutation de l'acide aminé candidat pour la modification post-traductionnelle en le remplaçant par un acide aminé aliphatique type valine ou alanine. Le mutant  $\Delta porA-porH::S15VporA-porH$  a été construit après transformation de *C. glutamicum*  $\Delta porA-porH$  par un plasmide contenant le gène *porA*, muté au niveau de la sérine 15 en valine, en opéron avec le gène de *porH* natif. Chez *C. glutamicum*, de façon native, ces deux gènes sont organisés en opéron et sont sous le contrôle du même promoteur. Après culture de ce mutant, les extraits protéiques de ce mutant ont été analysés comme précédemment en MALDI-TOF. On n'observe pas de pic centré sur  $m/z = 5200$ , zone correspondant à la masse de PorA mycoloylée. Un pic simple à  $m/z = 4715$  correspondant à la masse de PorA S15V sans modification post-traductionnelle est observé. La présence des ions à  $m/z$  6662, 6688 et 6714 correspondants aux masses de PorH mycoloylée permet de valider la construction du mutant  $\Delta porA-porH::S15VporA-porH$  (Figure 35).

***L'acide corynomycolique est donc lié par un lien ester à la sérine en position 15 de PorA, en accord avec les résultats du séquençage d'Edman.***

A) PorA chez *C. glutamicum* ATCC13032  
 MENVYEF~~LNLDVLS~~GSGLIGYVFDFLGASSKWAGAVADLIGLLG  
 M+Na<sup>+</sup> sans acide corynomycolique = 4703.39  
 M+Na<sup>+</sup> avec acide corynomycolique = 5181.24

↓

PorA chez le mutant S15VPorA-PorH  
 MENVYEF~~LNLDVLS~~GSGLIGYVFDFLGASSKWAGAVADLIGLLG  
 M+Na<sup>+</sup> sans acide corynomycolique = 4715.45



**Figure 35 :** A) Séquences de PorA de *C. glutamicum* et du mutant  $\Delta porA-porH::S15VporA-porH$ . B) Analyse du mutant  $\Delta porA-porH::S15VporA-porH$  en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

#### V.1.4.3 *Localisation par mutagénèse dirigée sur PorH*

Le séquençage d'Edman effectué sur la protéine PorH n'a permis d'identifier que les 13 premiers acides aminés de la protéine (Hunten *et al*, 2005a). Aucun dérivé phénylthiohydantoïne laissant penser à une modification post-traductionnelle n'ayant été décrit, l'équipe du Pr. N. Bayan a entrepris des mutagénèses dirigées sur les sérines et thréonines de PorH, acides aminés possédant un hydroxyle susceptible de faire un lien ester avec l'acide corynomycolique.

Tous les mutants ponctuels des sérines et thréonines ont été construits mais l'analyse en MALDI-TOF d'extraits organiques de ces mutants donne les mêmes résultats. C'est à dire, un pic hétérogène à  $m/z=6667$  est obtenu correspondant à la masse de PorH muté au niveau de la sérine ou de la thréonine en alanine avec un acide mycolique. Par cette méthode de mutagénèse dirigée et analyse en MALDI-TOF, aucun de ces sites n'a pu être identifié comme portant un acide corynomycolique.

Une des hypothèses avancées est que la mycoloylation sur PorH peut s'effectuer sur différents sites et que la mutation du site préférentiel favoriserait la mycoloylation sur un autre site.

Une approche structurale sur les protéines PorA-PorH par Résonance Magnétique Nucléaire est actuellement en cours dans l'équipe du Pr Alain Milon (IPBS Université Toulouse III) ; cela devrait nous permettre d'identifier la position de la modification post-traductionnelle sur PorH. La fréquence de résonance étant dépendante de l'environnement du noyau étudié, un atome va avoir un déplacement chimique différent. En effet, la présence de l'acide corynomycolique sur un acide aminé devrait modifier certains de ses déplacements chimiques caractéristiques. En comparant les spectres obtenus sur la protéine avec ou sans modification, on espère pouvoir définir l'acide aminé portant l'acide mycolique pour PorH.

*Nous avons donc mis en évidence, pour la première fois, par l'utilisation conjointe de différentes techniques (traitement chimique, spectrométrie de masse, mutagénèse..) que des petites protéines bactériennes pouvaient être O-acylées.*

Ce type de modification n'a été identifié que sur deux protéines eucaryotes, dont l'hormone de croissance appelé Ghréline. Comme pour PorA, cette protéine est acylée sur une sérine par un acide octanoïque et cette modification est indispensable à son activité (Kojima *et al*, 1999).

## V.2 Impact de l'acylation sur l'activité porine de PorA-PorH

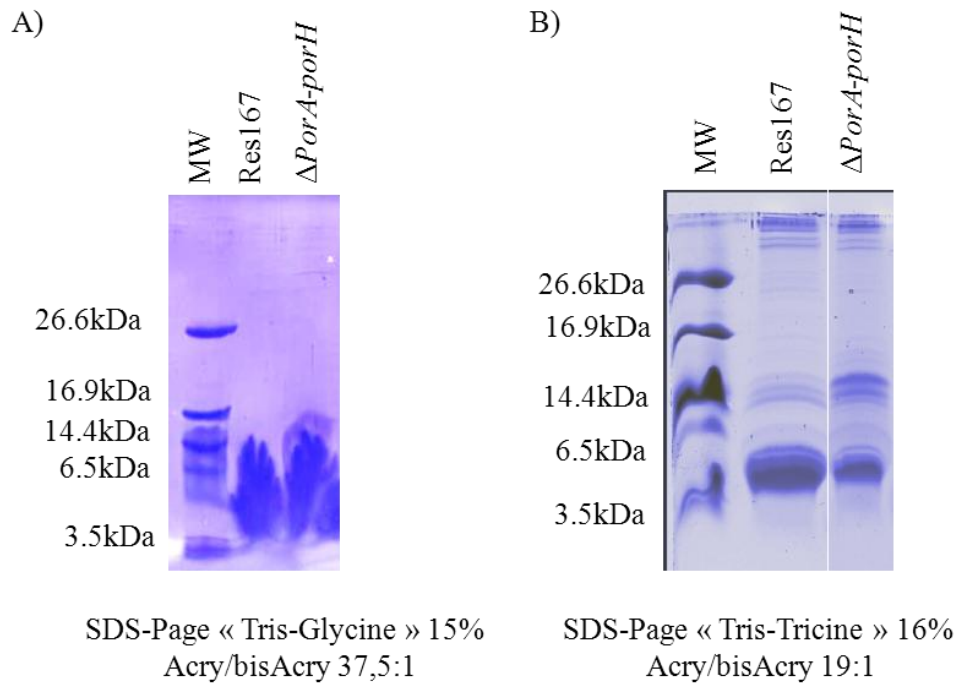
La présence d'un acide corynomycologique sur les protéines PorA et PorH a-t-elle une influence sur leur activité porine ? Les protéines PorA et PorH sont décrites comme étant des porines dont l'activité est de 2,5 nS pour un hétérooligomère PorA-PorH (Barth *et al*, 2010). Toutes les études publiées ont été effectuées à partir de protéines extraites de *C. glutamicum* ATCC13032 donc possédant un acide corynomycologique. La question qui se pose maintenant est de savoir quel est l'impact de cette modification sur l'activité porine de l'hétérooligomère.

### V.2.1 Purification et problèmes rencontrés

Les différentes porines décrites chez les *Corynebacterineae* sont extraites des bactéries à l'aide de solvants organiques (chloroforme/méthanol), classiquement utilisés pour l'extraction de lipides. Afin de les purifier, les protéines sont ensuite précipitées dans l'éther diéthylique puis séparées par chromatographie échangeuse d'anions comme décrit dans les différentes publications pour PorA et PorH (Costa-Riu *et al*, 2003a; Hunten *et al*, 2005a; Lichtinger *et al*, 2001). Dans le but d'étudier l'activité de chacune de ces protéines et d'évaluer l'importance de la modification post-traductionnelle, nous avons essayé de les séparer. Tout d'abord, nous avons utilisé le protocole de chromatographie échangeuse d'anions décrit, basé sur la présence d'acides aminés acides dans PorA et PorH (Lichtinger *et al*, 2001). PorA possèdent trois acides aspartiques et deux acides glutamiques et PorH six acides aspartiques et trois acides glutamiques. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par gel SDS-PAGE, Western-blot et MALDI-TOF.

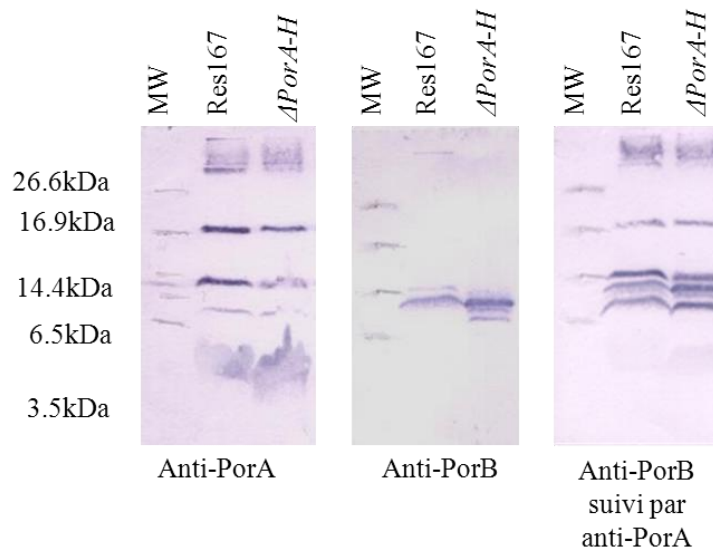
L'analyse sur gel et par Western-blot des fractions obtenues fut très laborieuse. En effet, l'analyse sur gel SDS-PAGE a nécessité beaucoup de mises au point du fait du faible masse moléculaire de ces trois protéines (< 10 kDa). Au départ, le protocole « classique » de Laemmli (Laemmli, 1970; Schagger, 2006) a été utilisé pour la séparation des protéines sur un gel à 15% d'acrylamide/bisacrylamide de rapport 37,5/1 avec une migration dans un tampon Tris-Glycine. Ce protocole ne permettait pas d'avoir une séparation correcte des protéines et une bonne reproductibilité dans les zones de faibles masses (Figure 36A). Nous avons opté par la suite pour le protocole de Schagger (Schagger & von Jagow, 1987) mieux adapté aux petites protéines consistant à effectuer une migration dans un tampon Tris-Tricine d'un gel à 16% d'acrylamide/bisacrylamide de rapport 19/1. Le changement du rapport acrylamide/bisacrylamide permet d'obtenir une réticulation plus importante du gel et donc

d'obtenir une meilleure séparation au niveau des protéines de faible masse moléculaire. L'utilisation de ce protocole a permis d'obtenir des bandes avec une meilleure résolution (Figure 36B). La comparaison des profils des gels entre *C. glutamicum* ATCC13032 et le mutant  $\Delta porA-porH$  montre peu de différence.



**Figure 36 :** Gel SDS-PAGE d'un extrait protéique de *C. glutamicum* sauvage Res167 et du mutant  $\Delta porA-porH$  A) migration en tampon Tris-Glycine gel 16 % acrylamide/bisacrylamide 37,5:1 B) migration en tampon Tris-Tricine gel 16 % acrylamide/bisacrylamide 19:1

Afin d'identifier clairement la bande correspondant à PorA, PorH et à la protéine X, nous avons effectué un western blot avec des anticorps anti-PorA et anti-PorB (anticorps fournis par l'équipe du Pr. R. Benz). Nous n'observons pas de différence entre l'extrait protéique de *C. glutamicum* ATCC13032 et le mutant  $\Delta porA-porH$  avec l'anticorps anti-PorA (Figure 37). De plus, nous observons avec ce même anticorps la révélation de plusieurs bandes de plus haute masse moléculaire que PorA dans les deux souches. Nous avons conclu que les anticorps anti-PorA à notre disposition sont non spécifiques et que des réactions croisées avec d'autres protéines sont observées. Ceci a été confirmé par l'étude récente sur l'activité de l'hétéroooligomère PorA-PorH (Barth *et al*, 2010).



**Figure 37 :** Western-Blot avec des anticorps anti-PorA et anti-PorB sur des extraits protéiques de *C. glutamicum* sauvage (Res167) et du mutant  $\Delta$ PorA-PorH

Plusieurs tentatives de purification par chromatographie échangeuse d'anions ont été effectuées mais aucune des fractions analysées ne contenait une des trois protéines pures. C'est l'analyse des fractions de purification en MALDI-TOF qui nous a permis de voir que les protéines étaient en mélange.

D'autres tentatives de purification sur différentes phases ont été testées comme en phase inverse C18 par HPLC ou par chromatographie d'exclusion avec une phase spécifique de petites protéines (Sephadex LH-20). Aucune de ces méthodes n'a donné des résultats concluants.

Les efforts de purification de PorA, PorH et la protéine X s'étant révélés infructueux, les études d'activité ont été réalisées sur l'extrait protéique total.

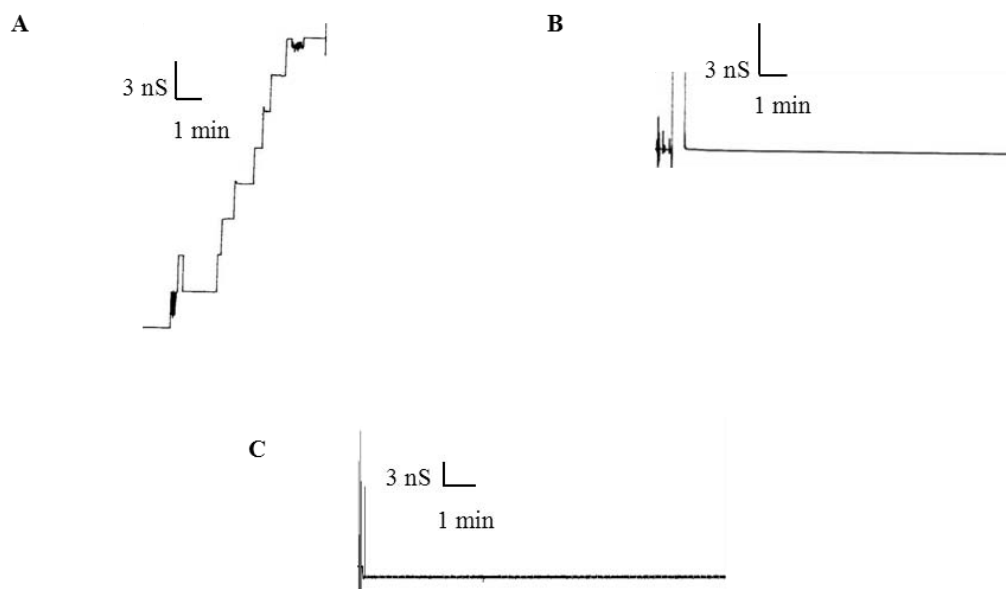
R. Benz et son équipe sont arrivés à la même conclusion mais ces travaux ont été publiés à la fin de mon étude (Barth *et al*, 2010).

### V.2.2 Mesure d'activité par « Black lipid membrane »

Les expériences sur des extraits du mutant  $\Delta$ OtsAATreYATreS montrent qu'il n'y a pas d'activité porine. Est-ce dû à l'absence de mycomembrane ou bien à l'absence de la modification post-traductionnelle ? Une étude de l'activité porine a été effectuée en collaboration avec Alexandre Ghazi (IBBMC, Université ParisXI-Orsay) sur le mutant  $\Delta$ porA-porH::S15VPorA-PorH et sur un extrait de protéines déacylées après traitement



alcalin. L'analyse de l'extrait de *C. glutamicum* sauvage montre une activité de 3 nS comparable à l'activité publiée dernièrement (Barth *et al*, 2010). Cette activité est retrouvée lors de l'analyse de l'extrait protéique du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé en présence de tréhalose, condition permettant de restaurer la mycomembrane (Figure 38A). Comme attendu, ce mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé uniquement sur saccharose ne présente aucune activité porine. De même, l'analyse d'un extrait organique de *C. glutamicum* sauvage après traitement alcalin qui permet de cliver la modification post-traductionnelle de PorA et PorH montre une absence d'activité (Figure 38B). La modification post-traductionnelle joue donc un rôle prépondérant dans l'activité porine de l'hétérooligomère PorA-PorH mais est-elle nécessaire sur les deux protéines ? La Figure 38C nous montre l'enregistrement obtenu pour le mutant  $\Delta porA-porH::S15VPorA-PorH$  dans lequel seul PorH est mycoloylée. Dans cette souche, le complexe n'a aucune activité dans les conditions testées, ce qui démontre que la mycoloylation sur PorA est indispensable à l'activité porine dans des concentrations protéiques équivalentes à celles des autres souches analysées. Cependant des tests en augmentant la concentration en protéine 5 fois permet de retrouver une activité de 3 nS. Une analyse plus complète est actuellement en cours avec l'équipe du Pr A. Milon à partir de protéines PorA et PorH purifiées de *C. glutamicum* à l'aide d'une étiquette histidine, constructions obtenues récemment par Barth *et al* (Barth *et al*, 2010).



**Figure 38 :** Analyse de l'activité porine de l'hétérooligomère PorA-PorH en BLM dans des membranes de PC/PS/n-decane A) extrait organique de *C. glutamicum* sauvage ou du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé en présence de tréhalose ; B) extrait organique de *C. glutamicum* sauvage après déacylation alcaline ou du mutant  $\Delta OtsA\Delta TreY\Delta TreS$  cultivé sans tréhalose ; C) extrait organique du mutant  $\Delta porA-porH::S15VPorA-PorH$

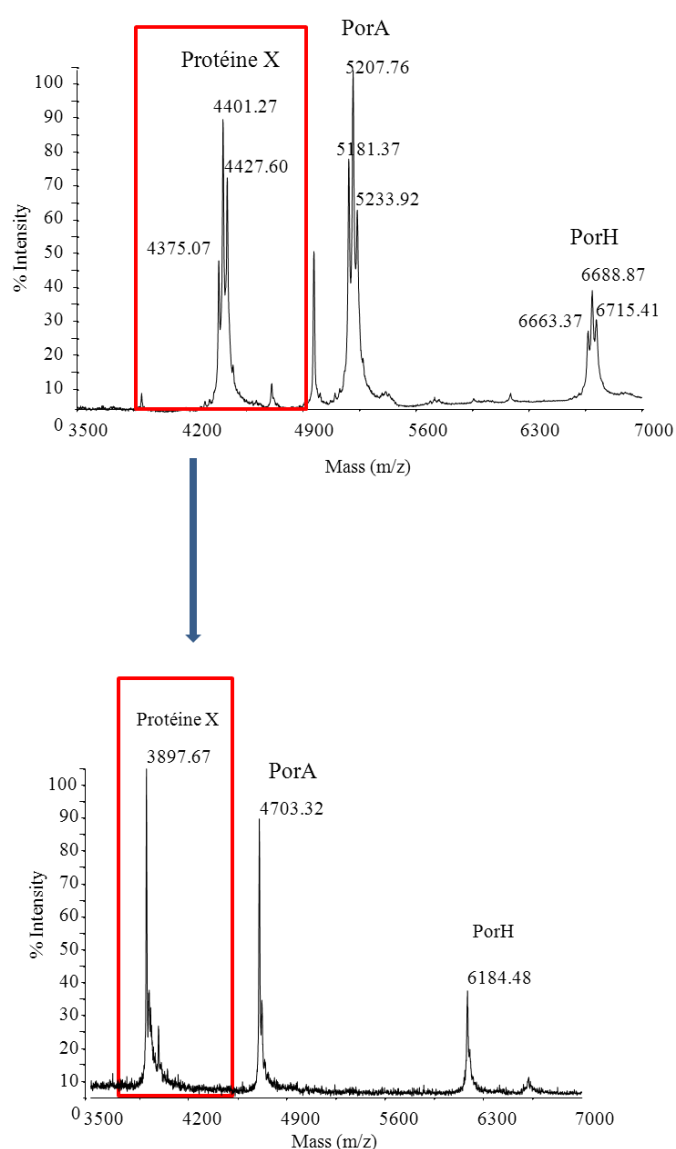
*En conclusion, nous avons démontré la présence d'une nouvelle modification post-traductionnelle chez C. glutamicum ATCC 13032 que nous avons appelé O-mycoloylation. Cette modification est retrouvée sur deux petites protéines PorA et PorH formant un hétérooligomère ayant une activité porine cation sélective qui est dépendante de la présence l'acide corynomycolique ainsi que sur la protéine X non identifiée jusqu'à nos récents travaux.*

L'ensemble de ce travail a donné lieu à une publication dans « Journal biological chemistry » : O-mycoloylated proteins from Corynebacterium: an unprecedented post-translational modification in bacteria (Huc *et al*, 2010).

## Chapitre VI Identification de la protéine X

Parmi les protéines mycoloylées présentes chez *C. glutamicum*, l'analyse MALDI-TOF a montré qu'il existe une protéine de  $m/z$  4375, 4401 et 4427, la protéine X (Figure 39A). Après traitement alcalin, ces pics de masse sont déplacés à  $m/z$  de 3897. Cela concorde avec une *O*-acylation de la protéine X (504 uma comme pour PorA et PorH) (Figure 39B).

Cette protéine de masse centrée sur  $m/z=4401$  n'étant pas décrite, nous avons donc voulu l'identifier.



**Figure 39 :** A) Spectre de l'extrait protéique de *C. glutamicum* avant déacylation alcaline B) Analyse de la phase aqueuse après traitement alcalin et dialyse. Les spectres sont obtenus par MALDI-TOF en mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

Différentes méthodes comme la spectrométrie de masse MS-MS et le séquençage d'Edman ont été mises en œuvre mais aucune n'a permis d'obtenir des résultats exploitables pour caractériser cette protéine X. Pour pallier ces difficultés, nous avons opté pour une « approche génomique ». Nous avons effectué la recherche sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sur le génome séquencé de *C. glutamicum* ATCC13032 (NCBI Reference Sequence: NC\_006958.1) (Kalinowski *et al*, 2003). Nous avons choisi de rechercher des protéines selon leur taille entre 0 et 45 acides aminés (taille de PorA). 39 protéines sont annotées dans le génome remplissant ce critère. Pour chacune de ces protéines, nous avons calculé la masse moléculaire théorique (Tableau 7). Seulement deux protéines pouvaient correspondre à la protéine X : cg2094, avec une masse moléculaire de 3895Da, et cg2875, avec une masse moléculaire de 3874Da. Les ions correspondant à PorA et PorH désorbant sous forme d'adduits sodium, l'hypothèse la plus probable était que la protéine X correspondait à l'ORF cg2875 ce qui donne une masse sous forme d'adduit sodium de 3897 (Figure 40).

La comparaison des spectres obtenus précédemment avec les masses théoriques montrent que la protéine putative cg2875 sous forme d'adduit sodium correspondrait parfaitement avec les données obtenues tandis que cg2094 serait comparable en adduit proton avec un léger défaut de masse (-2) par rapport aux valeurs expérimentales (Figure 40).

Afin de voir si la protéine X est codée par le gène cg2875, j'ai entrepris sous la direction du Dr Christine Houssin (IGM, Université Paris-Sud11-Orsay) la délétion du gène chez *C. glutamicum* res167 par double recombinaison homologue avec une cassette de résistance à la kanamycine.

Product Name	Start	End	Strand	Length	Accession	Locus	Locus_tag	MW
putative secreted protein	21426	21527	+	33	<a href="#">YP_224317.1</a>	-	cg0033	<b>3291</b>
O-methyl transferase (C-terminal fragment)	188123	188260	+	45	<a href="#">YP_224474.1</a>	-	cg0219	<b>4860</b>
hypothetical protein cg0305	269030	269128	+	32	<a href="#">YP_224550.1</a>	-	cg0305	<b>3428</b>
hypothetical protein cg0398	345812	345910	-	33	<a href="#">YP_224629.2</a>	-	cg0398	<b>3659</b>
transposase	378094	378231	+	45	<a href="#">YP_224656.1</a>	tnp17b(ISCg17a)	cg0427	<b>5481</b>
hypothetical protein cg0493	436309	436446	+	45	<a href="#">YP_224715.1</a>	-	cg0493	<b>2444</b>
hypothetical protein cg0494	436462	436563	+	33	<a href="#">YP_224716.1</a>	-	cg0494	<b>4163</b>
hypothetical protein cg0734	649773	649892	-	39	<a href="#">YP_224927.1</a>	-	cg0734	<b>4163</b>
hypothetical protein cg0758	672355	672474	+	39	<a href="#">YP_224948.1</a>	-	cg0758	<b>4464</b>
hypothetical protein cg1013	943572	943706	-	44	<a href="#">YP_225181.1</a>	-	cg1013	<b>4513</b>
hypothetical protein cg1085	1008201	1008335	-	44	<a href="#">YP_225243.1</a>	-	cg1085	<b>5013</b>
hypothetical protein cg1161	1077021	1077113	+	30	<a href="#">YP_225311.1</a>	-	cg1161	<b>3399</b>
hypothetical protein cg1210	1113709	1113801	-	30	<a href="#">YP_225354.1</a>	-	cg1210	<b>3400</b>
putative secreted protein	1243621	1243743	-	40	<a href="#">YP_225472.1</a>	-	cg1336	<b>2796</b>
hypothetical protein cg1471	1368634	1368756	+	40	<a href="#">YP_225588.1</a>	-	cg1471	<b>4292</b>
transposase-fragment	1408463	1408576	-	37	<a href="#">YP_225628.1</a>	tnp24a(ISCg24a)	cg1515	<b>4345</b>
hypothetical protein cg1849	1745312	1745440	+	42	<a href="#">YP_225928.1</a>	-	cg1849	<b>3970</b>
putative secreted protein	1792303	1792428	-	41	<a href="#">YP_225970.1</a>	-	cg1902	<b>3971</b>
putative secreted or membrane protein	1799319	1799441	-	40	<a href="#">YP_225978.1</a>	-	cg1910	<b>4625</b>
hypothetical protein cg1914	1802102	1802233	+	43	<a href="#">YP_225982.1</a>	-	cg1914	<b>4584</b>
hypothetical protein cg2045	1938346	1938450	+	34	<a href="#">YP_226105.1</a>	-	cg2045	<b>3933</b>
<b>hypothetical protein cg2094</b>	<b>1984044</b>	<b>1984148</b>	<b>+</b>	<b>34</b>	<a href="#">YP_226153.1</a>	-	<b>cg2094</b>	<b>3895</b>
hypothetical protein cg2156	2041673	2041792	+	39	<a href="#">YP_226208.1</a>	-	cg2156	<b>4124</b>
hypothetical protein cg2287	2171478	2171594	-	38	<a href="#">YP_226322.1</a>	-	cg2287	<b>4091</b>
hypothetical protein cg2325	2208510	2208641	+	43	<a href="#">YP_226357.1</a>	-	cg2325	<b>4788</b>
hypothetical protein cg2555	2435832	2435945	-	37	<a href="#">YP_226570.1</a>	-	cg2555	<b>4375</b>
50S ribosomal protein L36	2652894	2653016	-	40	<a href="#">YP_226774.1</a>	rpmJ	cg2791	<b>4694</b>
<b>hypothetical protein cg2875</b>	<b>2736301</b>	<b>2736417</b>	<b>-</b>	<b>38</b>	<a href="#">YP_226838.1</a>	-	<b>cg2875</b>	<b>3874</b>
porin	2861249	2861386	-	45	<a href="#">YP_226953.1</a>	porA	cg3008	<b>4680</b>
hypothetical protein cg3009	2861470	2861643	-	57	<a href="#">YP_226954.1</a>	porH	cg3009	<b>6161</b>
hypothetical protein cg3205	3071084	3071185	-	33	<a href="#">YP_227136.1</a>	-	cg3205	<b>3730</b>
hypothetical protein cg3238	3100577	3100693	-	38	<a href="#">YP_227167.1</a>	-	cg3238	<b>4347</b>
hypothetical protein cg3276	3134910	3135011	+	33	<a href="#">YP_227202.1</a>	-	cg3276	<b>3435</b>
transposase-fragment	3136001	3136114	+	37	<a href="#">YP_227204.1</a>	tnp20a(ISCg20a)	cg3278	<b>4125</b>
putative dehydrogenase-fragment	3136162	3136290	-	42	<a href="#">YP_227205.1</a>	-	cg3279	<b>4580</b>
hypothetical protein cg3288	3144229	3144339	+	36	<a href="#">YP_227214.1</a>	-	cg3288	<b>3923</b>
hypothetical protein cg3294	3148088	3148201	-	37	<a href="#">YP_227220.1</a>	-	cg3294	<b>4001</b>
hypothetical protein cg3408	3260384	3260509	-	41	<a href="#">YP_227326.1</a>	-	cg3408	<b>4927</b>
hypothetical protein cg3434	3282519	3282632	+	37	<a href="#">YP_227351.1</a>	-	cg3434	<b>4308</b>

**Tableau 7 :** ORFs codant pour des protéines de 0 à 45 acides aminés chez *C. glutamicum* ATCC13032

A)

**Protéine hypothétique Cg2875**

MTSVFDIIQSIFDGVHGLVGSIFAGAQGVFDSIVTASS

	<b>Mav + H<sup>+</sup></b>	<b>Mav + Na<sup>+</sup></b>
Sans modification post-traductionnelle	3875,41	<b>3897,41</b>
<b>C32:0</b>	4353,25	<b>4375,25</b>
<b>C34:1</b>	4379,29	<b>4401,29</b>
<b>C36:2</b>	4405,33	<b>4427,33</b>

B)

**Protéine hypothétique Cg2094**

MFINVMPEPGLGGLIQRFMQWISCMSFGECMVIQ

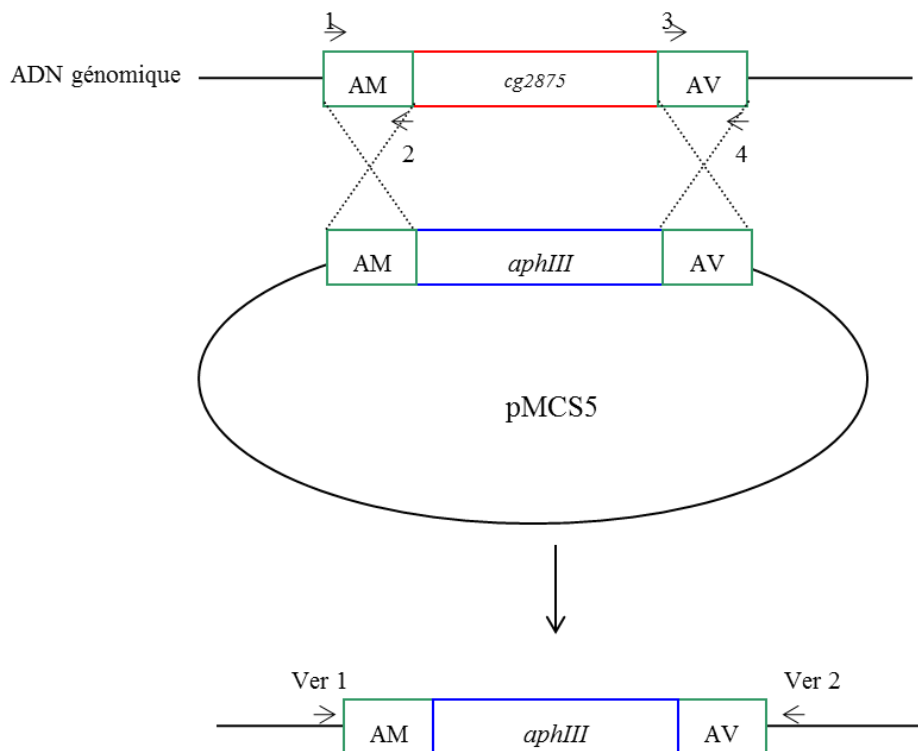
	<b>Mav + H<sup>+</sup></b>	<b>Mav + Na<sup>+</sup></b>
Sans modification post-traductionnelle	<b>3895.80</b>	3917.80
<b>C32:0</b>	<b>4373.64</b>	4395.64
<b>C34:1</b>	<b>4399.68</b>	4421.68
<b>C36:2</b>	<b>4425.71</b>	4447.71

**Figure 40 :** Calcul des masses théoriques sous forme d'ions  $[M+H]^+$  ou  $[M+Na]^+$  avec ou sans modification post-traductionnelle pour Cg2875 (A) et pour Cg2094 (B).

## VI.1 Construction du mutant $\Delta cg2875::km$

Le but est de déléter le gène candidat par échange allélique avec *aphIII* (gène de résistance à la kanamycine) (Figure 41). Pour cela, on amplifie par PCR une séquence en amont (AM) de l'ORF à déléter grâce aux amorces 1 et 2 et une séquence en aval (AV) grâce aux amorces 3 et 4. Chaque amorce contient un site de restriction afin de pouvoir liguer les fragments PCR (AM et AV) avec le gène *aphIII* dans le plasmide pMCS5 (non répliquatif chez *C. glutamicum*) pour donner le plasmide de délétion.

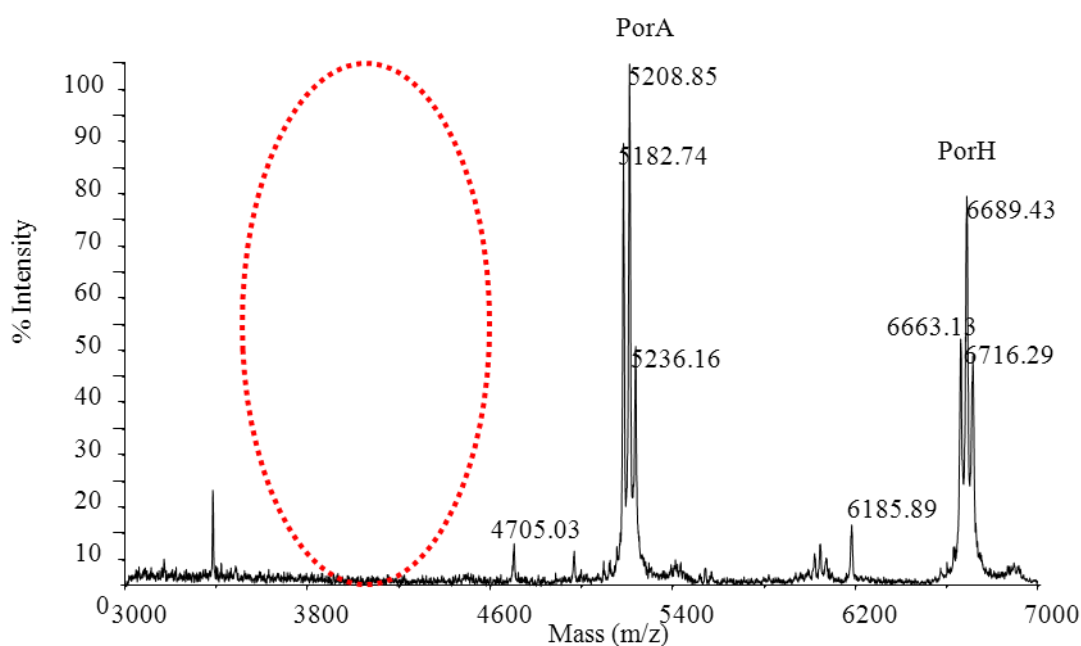
Après amplification chez *E. coli* DH5 $\alpha$ , le plasmide de délétion est utilisé pour transformer *C. glutamicum* Res167. L'échange de gène est vérifié par PCR grâce aux amorces ver1 et ver2 et le fragment obtenu est séquencé (Figure 41). Deux clones portant la délétion du gène *cg2875* ont été obtenus ( $\Delta cg2875::km$ ).



**Figure 41** : Schéma de construction du mutant  $\Delta cg2875::km$

## VI.2 Analyse du mutant de délétion $\Delta cg2875::km$ (souche CGL2060)

Nous avons entrepris l'analyse des extraits protéiques de ces deux clones en MALDI-TOF. Pour chaque clone, nous observons la présence de PorA (pic centré sur 5208) et de PorH (pic centré sur 6689) par contre aucun pic n'est observé dans la zone à 4400 (Protéine X mycoloylée) ni dans la zone à 3900 (Protéine X non mycoloylée) (Figure 42).



**Figure 42** : Analyse d'un extrait protéique du mutant  $\Delta cg2875::km$  en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

Nous pouvons conclure que le gène *cg2875* code pour la protéine X. Mais pour confirmer ce résultat, il est nécessaire de compléter la souche mutante par le gène *cg2875* afin de restaurer le phénotype sauvage. A l'heure actuelle, le plasmide de complémentation est construit mais des problèmes de transformation de *C. glutamicum* ont été rencontrés. En effet, les différents essais de transformation soit de la souche  $\Delta cg2875::km$ , soit de la souche sauvage ont échoué. Une hypothèse avancée serait un éventuel problème de toxicité de la protéine lors d'une expression importante. La délétion du gène n'a pas d'impact direct sur la croissance bactérienne ni sur sa morphologie.



Plusieurs questions se posent encore concernant la protéine X :

1) d'un point de vue structural :

a) Quel est le site de mycoloylation sur la protéine X ? Pour cela, comme pour PorA et PorH une étude par mutagénèse dirigée des acides aminés hydroxylés est envisagée.

b) Peut-on déterminer une séquence consensus ou un élément structural de mycoloylation pour les trois protéines ? L'alignement des trois protéines ne montre pas d'homologie évidente entre elles et donc une séquence consensus de mycoloylation ne peut être dégagée à partir des séquences primaires. Une autre approche serait de postuler que la reconnaissance du site de mycoloylation se fait par l'intermédiaire d'un motif structural particulier commun aux trois protéines. Pour ceci, il sera nécessaire d'établir la structure de chacune d'elles après surexpression et purification.

2) d'un point de vue fonctionnel

a) Quel est le rôle de cette petite protéine mycoloylée ?

b) Participe-t-elle à la formation d'une porine ?

c) A-t-elle un rôle uniquement associé à une autre protéine comme pour PorA-PorH ?

Dans un premier temps, l'activité porine de la protéine X purifiée pourrait être testée en BLM puis associée avec PorA et PorH afin de tester l'activité de différents oligomères potentiels. La construction d'un triple mutant PorA-H-protéine X permettrait peut-être d'obtenir un phénotype plus marqué et donc de définir un rôle plus précis de ces protéines.

Pour ces différentes questions, il nous est indispensable de maîtriser la complémentation du mutant en vue de définir le site de mycoloylation par mutagénèse dirigée ou bien purifier la protéine par chromatographie d'affinité à l'aide d'une étiquette histidine pour les différentes études d'activité.

## Chapitre VII cMytC : mycoloyltransférase responsable de la O-mycoloylation des protéines ?

La présence de cette nouvelle modification post-traductionnelle par un acide corynomycolique chez *C. glutamicum* est aussi la démonstration de la présence d'un nouvel accepteur d'acide mycolique chez les *Corynebacterineae*. Jusque-là, seuls des accepteurs de nature polyols (arabinose de l'arabinogalactane, tréhalose, glucose ou glycérol) avaient été décrits. Plusieurs études ont démontré que le transfert des acides mycoliques sur ces composés se fait par l'intermédiaire des mycoloyltransférases (Brand *et al*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004; Puech *et al*, 2000). Nous nous sommes donc intéressés à caractériser l'enzyme qui pourrait transférer l'acide corynomycolique sur les protéines PorA, PorH et la protéine X.

*C. glutamicum* possède six mycoloyltransférases (cMytA, B, C, D, E, F). Il a été démontré que les cmytA, B, D et F avaient une activité de transfert sur le MMT et l'arabinogalactane. Aucune activité n'avait été détectée pour cMytC (Brand *et al*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004). Brand *et al* ont cependant montré qu'un double mutant *cmytA*<sup>-</sup>/*cmytC* synthétisait moins de DMT.

Par ailleurs, la détermination de la structure tridimensionnelle des mycoloyltransférases de *M. tuberculosis*, Ag85A, B, C et D, a permis d'identifier deux sites de fixation du tréhalose (Anderson *et al*, 2001; Ronning *et al*, 2000; Ronning *et al*, 2004; Wilson *et al*, 2004). Des études comparatives par modélisation en 3 dimensions, basées sur la comparaison structurale avec les Ag85, des mycoloyltransférases de *C. glutamicum*, ont mis en évidence la présence des deux sites de fixation au tréhalose sur toutes les cMyts excepté sur cMytC. En effet, il a été proposé que le deuxième site de fixation chez cMytC ne puisse pas établir des interactions favorables avec le tréhalose pour deux raisons : la mutation des résidus dont la chaîne latérale est impliquée dans les interactions avec le tréhalose (D40N, R43D, S235K, S236C, K239D) et la présence d'une longue boucle d'insertion (20 acides aminés). Ces deux différences diminueraient l'affinité pour le tréhalose (Adindla *et al*, 2004; Ramulu *et al*, 2006) (Figure 19). L'ensemble de ces données nous a amené à émettre l'hypothèse que cMytC pouvait être impliquée dans le transfert d'acides mycoliques sur un substrat de nature non osidique.

## VII.1 Construction du mutant d'insertion *cmytC*

Pour valider cette hypothèse, j'ai inactivé le gène *cg0413* codant pour la protéine cMytC sous la direction du Dr. Christine Houssin.

Cette inactivation a été réalisée par interruption de l'ORF, grâce à un plasmide portant une séquence interne au gène susceptible de se recombiner (Figure 43). Pour cela, nous avons amplifié par PCR une partie de l'ORF du gène *cg0413* grâce aux amorces 1 et 2. Ce fragment a été ligué dans le vecteur TOPO pour donner le plasmide TOPO-*cg0413* (vecteur non répliquatif chez *C. glutamicum*). Après transformation de *C. glutamicum* par le TOPO-*cg0413*, des clones résistants à la kanamycine ont été sélectionnés et analysés par Western-blot avec des anticorps anti-cMytC et par PCR grâce aux amorces del-1, del-2, F-20 et Rev. Les fragments de PCR correspondant aux séquences bordant l'insertion ont été séquencés. Deux clones possédant le gène *cg0413* correctement interrompu ont été obtenus.

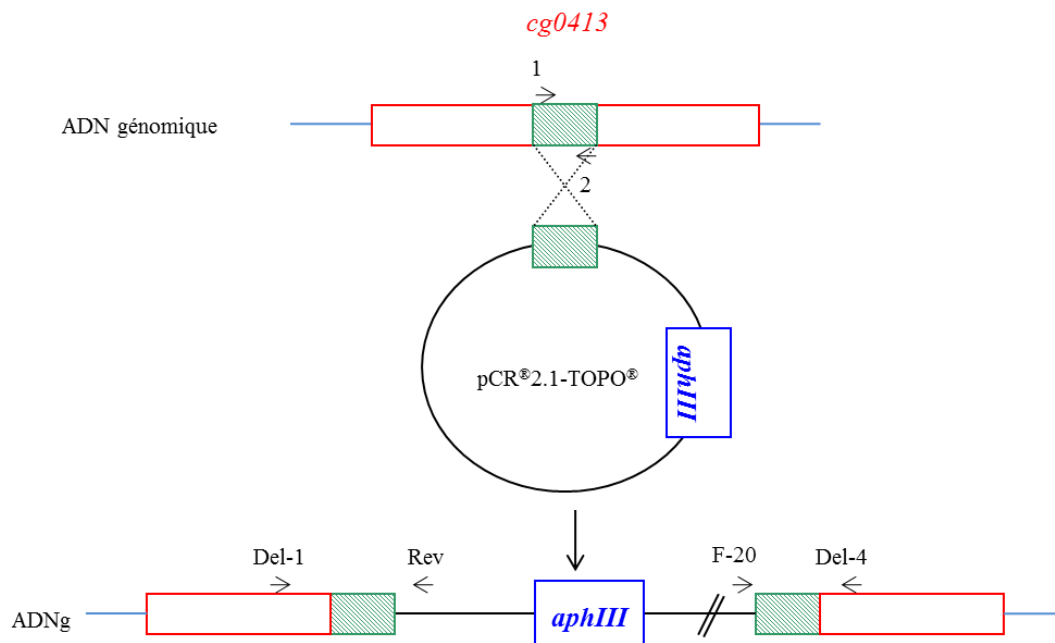
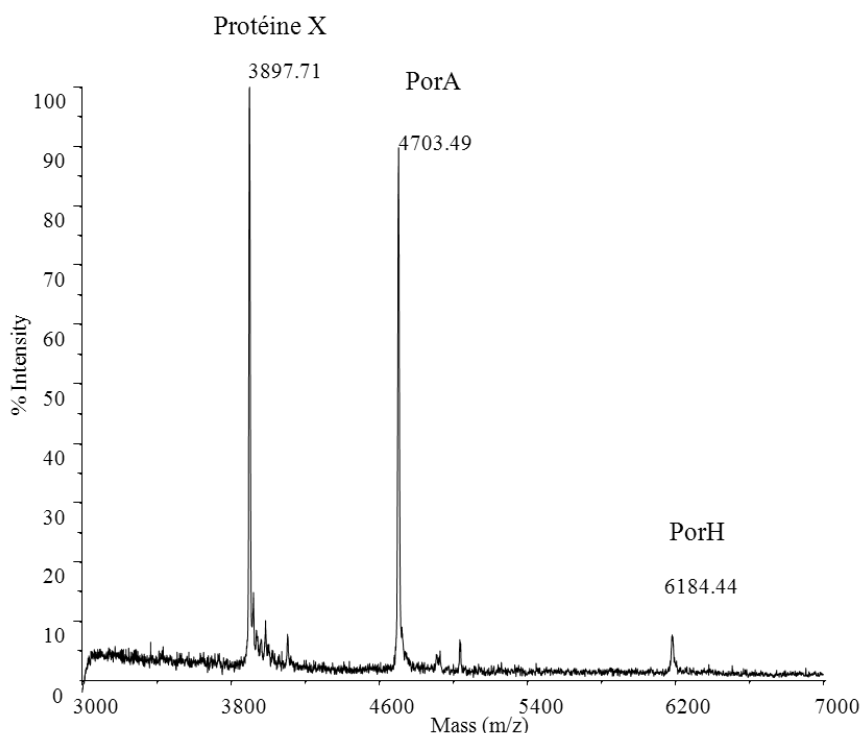


Figure 43 : Schéma de construction du mutant d'interruption *cmytC*

## VII.2 Analyse par spectrométrie de masse de la souche *cmytC*<sup>-</sup> (souche CGL2059)

Les protéines de la souche sauvage et de la souche CGL2059 sont extraites par des solvants organiques puis analysées en MALDI-TOF. Les spectres obtenus, à partir des extraits protéiques des deux clones *cg0413*<sup>-</sup>, sont comparables à ceux obtenus pour les mutants dépourvus d'acides mycoliques. En effet, nous observons l'absence des pics centrés sur *m/z* 4401, 5207 et 6688 correspondant respectivement à la protéine X, PorA et PorH mycoloylées. Les pics de *m/z* 3897, 4703 et 6184 correspondant aux protéines non mycoloylées sont visibles sur le spectre (Figure 44). Une analyse comparable à partir de la souche *cmytA*<sup>-</sup>, mycoloyltransférase principale pour le transfert des corynomycolates sur le tréhalose et l'arabinogalactane, montre la présence uniquement des pics correspondant aux protéines mycoloylées comme pour la souche sauvage. Ceci démontre que la mycoloyltransférase *cMytA* n'est pas impliquée dans la mycoloylation des protéines et qu'il n'y a pas de redondance entre *cMytC* et *cMytA*.

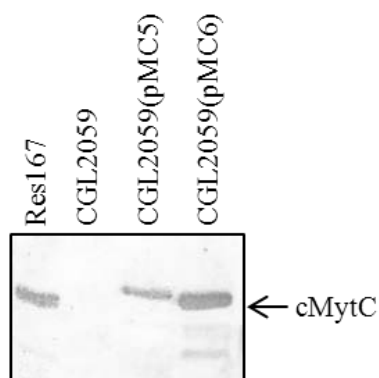


**Figure 44 :** Analyse d'un extrait protéique du mutant d'interruption *cmytC*<sup>-</sup> en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

### VII.3 Complémentation du mutant d'interruption *cmytC*

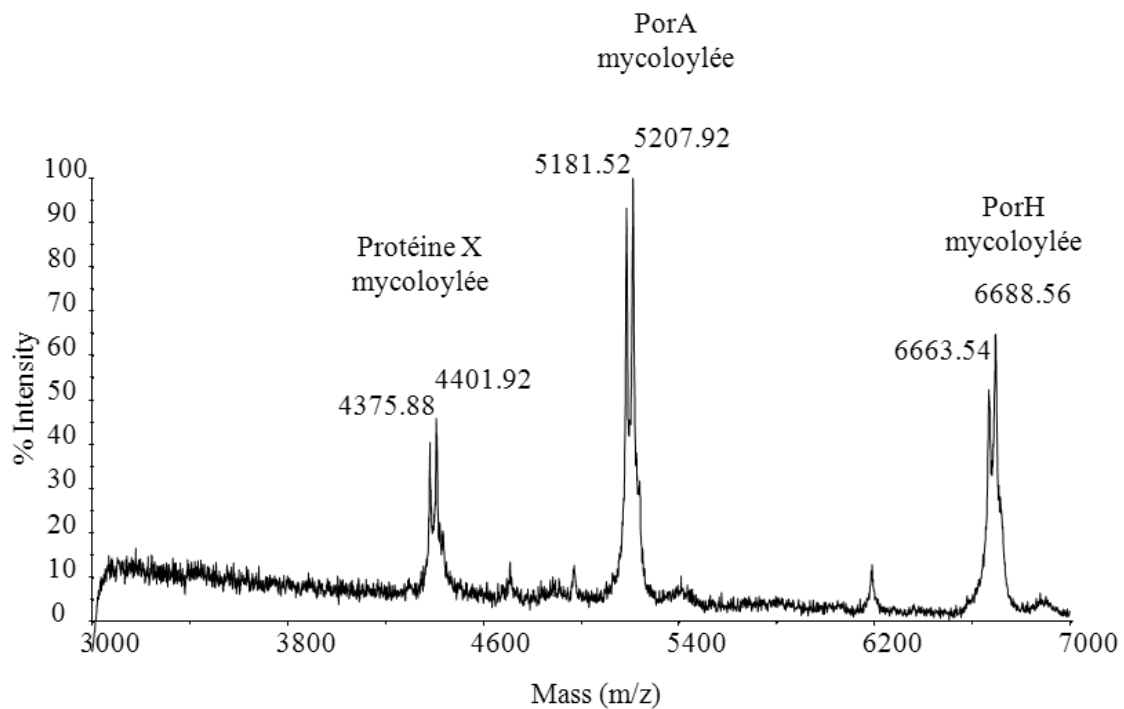
Afin de confirmer l'implication de cMytC dans la mycoloylation des protéines, nous avons effectué une expérience de complémentation. Pour cela, nous avons transformé la souche CGL2059 par deux plasmides fournis par le Pr N.Bayan (IBBMC, Université Paris-Sud 11-Orsay). Le plasmide pMC6 permet l'expression de la protéine native cMytC. Le plasmide pMC5 est quant à lui un plasmide permettant l'expression d'un variant cMytC possédant une étiquette histidine en C-terminal et une mutation de la glycine 339 en amont de l'histidine 341 catalytique.

Les clones obtenus après transformation par chacun de ces deux plasmides (souche CGL2059(pMC5) et souche CGL2059(pMC6)) ont été analysés par Western-Blot à l'aide d'anticorps anti-cMytC fournis par le Dr Christine Houssin (IGM, Université Paris-Sud 11-Orsay) afin de vérifier l'expression de la protéine cMytC puis par MALDI-TOF. L'analyse par Western-Blot montre dans les deux cas la présence de cMytC dans des extraits d'enveloppe (Figure 45).



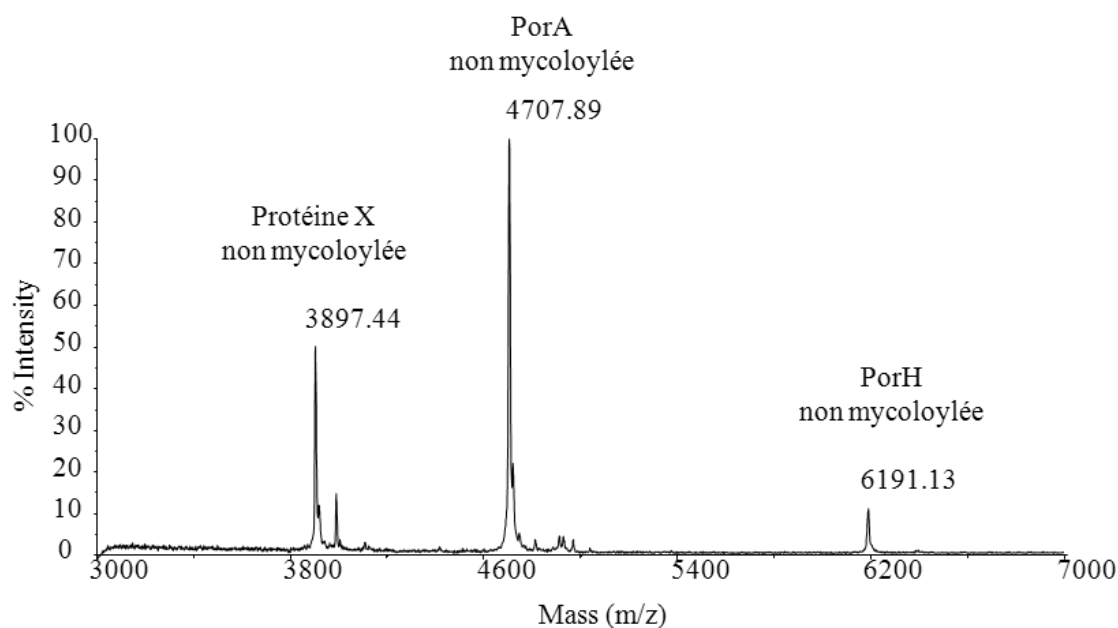
**Figure 45 :** Western-blot avec des anticorps anti-cMytC sur des extraits d'enveloppe de *C. glutamicum* sauvage Res167, sur la souche CGL2059, CGL2059(pMC5) et CGL2059(pMC6)

L'analyse de la souche CGL2059(pMC6) par MALDI-TOF, montre la présence des signaux correspondant aux protéines PorA, PorH et la protéine X mycoloylées (Figure 46). La transformation par le plasmide pMC6 de la souche CGL2059 permet donc de restaurer le phénotype sauvage.



**Figure 46 :** Analyse d'un extrait protéique de la souche CGL2059(pMC6) en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

L'analyse d'un extrait protéique issu de la souche CGL2059(pMC5) montre par contre la présence de signaux de  $m/z = 3897, 4703, 6184$  correspondant respectivement aux protéine X, PorA et PorH non mycoloylées (Figure 47). Il semblerait donc que la mutation ponctuelle de la glycine et/ou la présence de l'étiquette histidine ne permet(tent) plus à cMytC d'être active.



**Figure 47 :** Analyse d'un extrait protéique de la souche CGL2059(pMC5) en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ .

*cMytC* est donc l'enzyme impliquée spécifiquement dans la mycoloylation des protéines.

## VII.4 Analyse du profil lipidique de la souche CGL2059 (*cmytC*)

Dans les études précédentes, aucune différence au niveau du taux d'acides mycoliques entre les souches sauvage et le mutant *cmytC* n'était observée (Brand *et al*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004). Nous avons voulu vérifier ces données en effectuant à la fois un dosage, après hydrolyse, des acides corynomycoliques totaux et un dosage spécifique du MMT et DMT.

### VII.4.1 Quantification des acides mycoliques

Il est possible de quantifier séparément les acides mycoliques liés au tréhalose (MMT et DMT) et aux protéines (PorA, PorH et protéine X) de ceux liés à l'arabinogalactane. Les premiers sont obtenus après saponification de la fraction dite « lipides extractibles » car facilement extraits par des solvants organiques. Ceux liés à l'arabinogalactane sont obtenus par saponification des bactéries délipidées et sont contenus dans la fraction appelée « lipides liés ».

Nous avons effectué ce dosage sur les deux clones obtenus pour la souche CGL2059 et sur la souche sauvage (*C. glutamicum* Res167). Les résultats regroupés dans le Tableau 8 montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes souches ni sur le taux d'acides corynomycologiques liés ni pour les corynomycolates extractibles. Un 2<sup>ème</sup> dosage sera fait ultérieurement pour confirmer les résultats avec en parallèle la quantification sur la souche complémentée. Ce premier résultat est en accord avec les études précédentes effectuées sur les mycoloyltransférases de *C. glutamicum* (Brand *et al*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004).

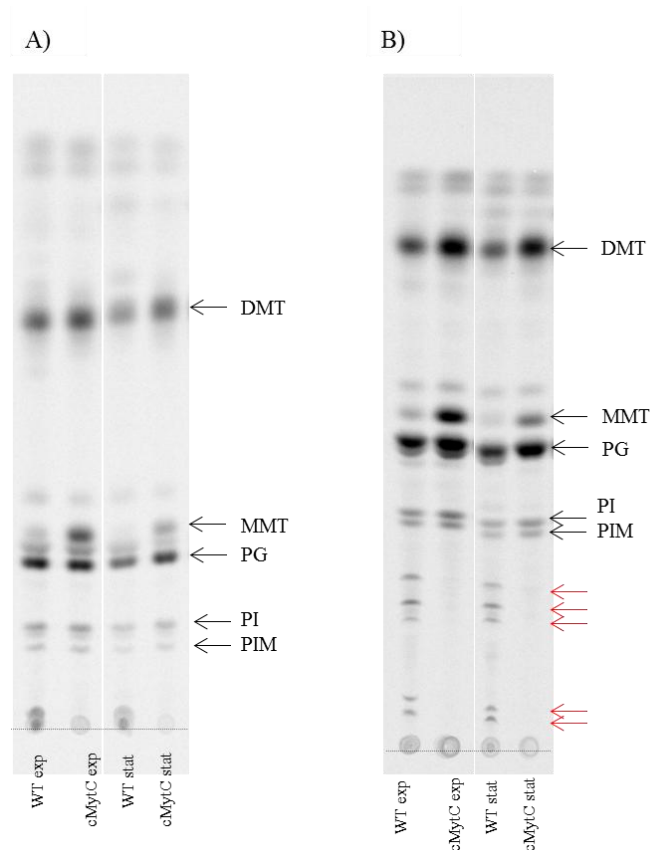
	Acides corynomycologiques liés	Acides corynomycologiques extractibles
<i>C. glutamicum</i> Res167	1.26%	28.5%
CGL2059 clone 1	1.35%	29.9%
CGL2059 clone 2	1.39%	30.4%

Tableau 8 : Quantification des acides corynomycologiques liés et extractibles des souches *C. glutamicum* RES167 et CGL2059.

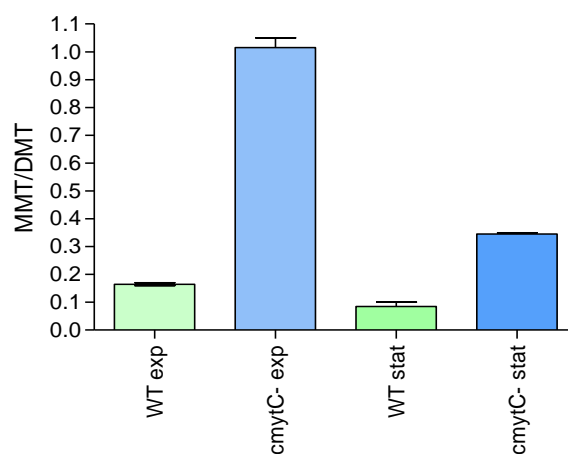
#### VII.4.2 Quantification du MMT et du DMT par marquage au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate

Du fait de la faible quantité de certains dérivés du tréhalose (MMT) présents dans les bactéries en phase stationnaire, la quantification a été réalisée par marquage au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate et autoradiographie. Le marquage s'effectue par incorporation de palmitate radiomarqué au cours de la culture bactérienne puis une extraction au chloroforme/méthanol est réalisée sur le culot bactérien. L'analyse se fait par CCM de silice suivie d'une autoradiographie. Grâce au logiciel «  $\mu$ quant », nous pouvons quantifier la radioactivité totale de chaque piste et déterminer le pourcentage relatif de chaque tache sur la piste et ainsi calculer le rapport MMT/DMT (en tenant compte que sur le DMT deux acides corynomycologiques sont marqués). Nous avons quantifié ces composés à la fois sur la souche sauvage et sur le mutant *cmytC* en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. L'analyse de la CCM (Figure 48A) montre une quantité de MMT six fois supérieure pour le mutant *cmytC* par rapport à la souche sauvage en phase exponentielle et quatre fois supérieure en phase stationnaire (Figure 49).





**Figure 48 :** A) Analyse par CCM du profil des lipides extractibles après marquage au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate et autoradiographie en phases exponentielle et stationnaire de *C. glutamicum* sauvage et du mutant *cmytC*. (solvant de migration  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 ) B) Analyse par CCM du profil des lipides extractibles après marquage au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate et autoradiographie en phases exponentielle et stationnaire de *C. glutamicum* sauvage et du mutant *cmytC*. (Solvant de migration  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  60:35:8 ). Les flèches indiquent les composés polaires absents dans la souche *cmytC*.



**Figure 49 :** Rapport MMT/DMT après marquage au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate en phase exponentielle (exp) et stationnaire (stat) de *C. glutamicum* sauvage et du mutant *cmytC*

Ce résultat était inattendu dans la mesure où, dans les études précédentes, aucune différence n'avait été reportée au niveau de la quantité de MMT entre un mutant *cmytC* et la souche sauvage (Brand *et al*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al*, 2003; Kacem *et al*, 2004).

L'accumulation de MMT observée ici suggère que le MMT pourrait être le substrat utilisée par cMytC pour transférer un acide corynomycologique sur les protéines, comme cela a été décrit pour cMytA vis-à-vis des autres accepteurs (Puech *et al*, 2000).

La CCM montre également des différences au niveau des lipides les plus polaires. En effet, on observe une radioactivité plus importante pour la souche sauvage au point de dépôt. Nous avons utilisé un solvant de migration plus éluant permettant la migration des composés très polaires (chloroforme/méthanol/eau 60 :35 :8 v/v/v). Dans ce solvant, on remarque la présence de cinq nouvelles bandes dans la souche sauvage qui sont absentes dans le mutant *cmytC*. En plus de l'accumulation du MMT dans le mutant *cmytC*, la mutation du gène *cg0413* entraîne la perte du marquage sur cinq autres composés non identifiés (Figure 48B). Ces composés correspondent-ils à différentes petites protéines modifiées par un acide mycolique et capables de migrer sur CCM ou bien s'agit-il de lipides dont la partie lipidique dépend de la présence de la protéine cMytC ? L'identification de ces composés est en cours au sein de l'équipe. Nous souhaitons maintenant nous pencher sur le mode d'action de la protéine cMytC. Actuellement, nous pouvons émettre deux hypothèses. La première est que l'enzyme cMytC serait impliquée directement dans le transfert de l'acide corynomycologique du MMT sur les protéines. Ceci expliquerait la différence observée par modélisation moléculaire au niveau du deuxième site de fixation du substrat avec une boucle d'insertion permettant des interactions favorables avec les protéines. La deuxième hypothèse est que cMytC serait une enzyme intermédiaire qui transférerait l'acide corynomycologique du MMT sur un autre composé, peut-être de nature lipidique, qui grâce à une nouvelle mycoloyltransférase, permettrait le transfert du corynomycolate sur les protéines.

Pour trancher entre ces hypothèses, nous souhaitons mettre en place un test *in vitro* de la protéine cMytC. En effet, l'expression et la purification de cette protéine ont été décrits récemment (Bou Raad *et al*, 2010). Une fois purifiée, la protéine pourrait être mise en présence d'un donneur d'acides mycoliques comme le MMT et d'un extrait protéique contenant PorA, PorH et la protéine X non mycoloylées. Si cMytC transfère directement un acide mycolique du MMT sur les protéines, la réaction pourra être suivie par analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des protéines mycoloylées.

## Chapitre VIII Recherche de protéines mycoloylées chez les *Corynebacterineae*

L'identification de protéines mycoloylées chez *C. glutamicum* nous interroge sur la présence de cette modification post-traductionnelle chez d'autres *Corynebacterineae*. Des protéines mycoloylées sont-elles présentes dans toutes les enveloppes des *Corynebacterineae* ou bien sont-elles spécifiques du genre *Corynebacterium*.

Pour identifier ces protéines chez les autres *Corynebacterineae*, nous avons procédé selon deux approches :

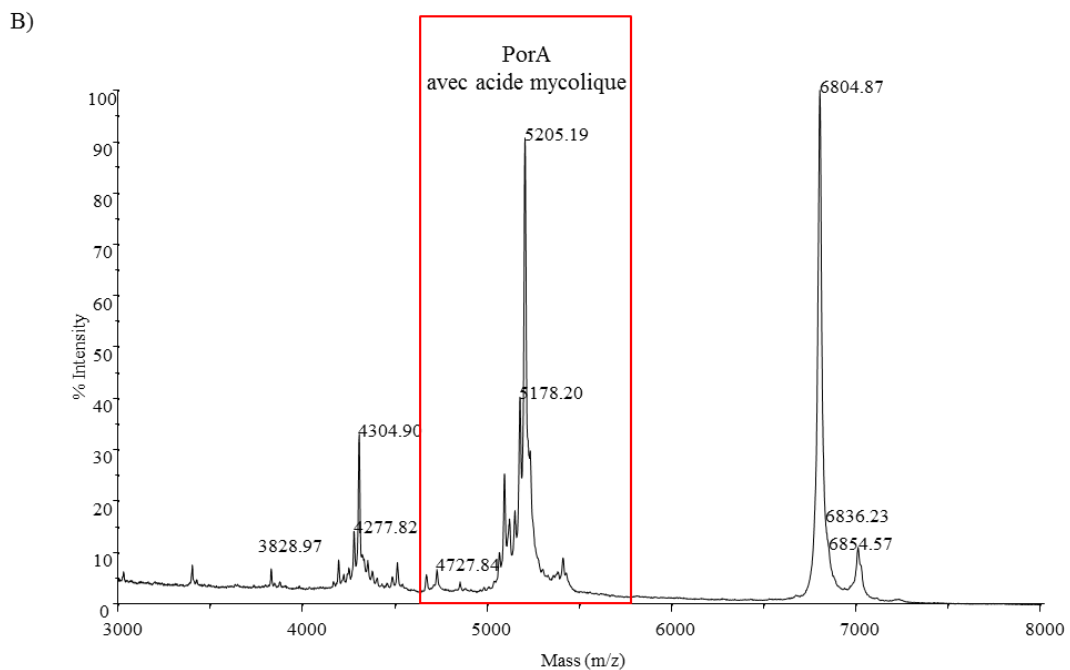
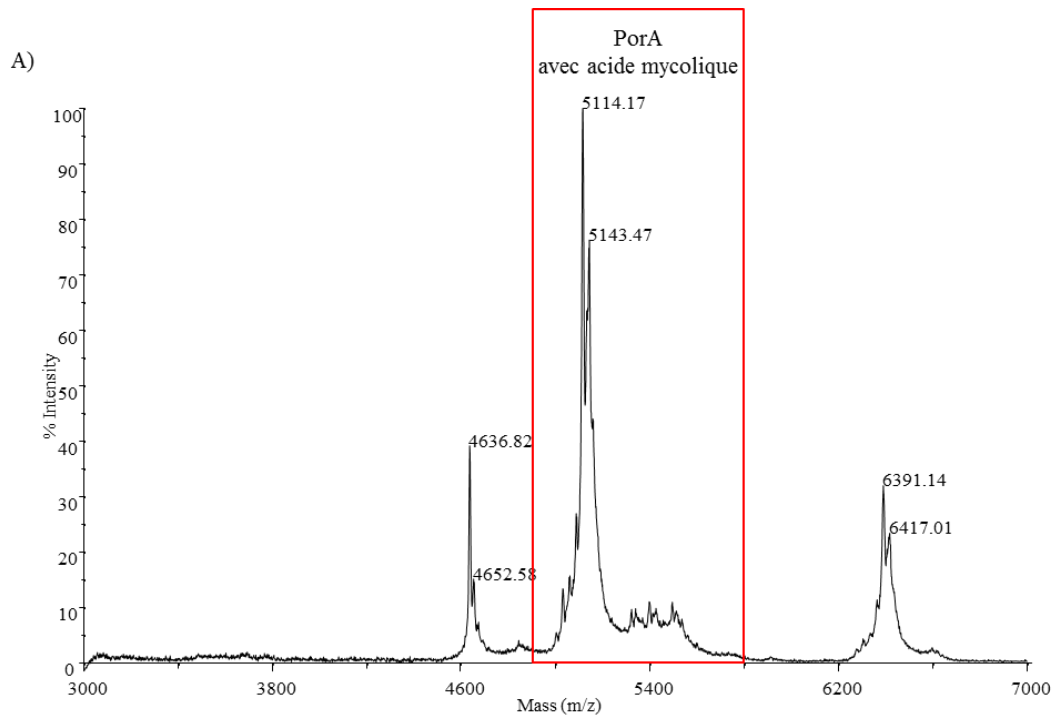
- La recherche de protéines orthologues à PorA, PorH et la protéine X
- La recherche de protéines orthologues à cMytC possédant la boucle d'insertion

### VIII.1 Recherche de protéines orthologues à PorA, PorH et protéine X

Dans des études précédentes, des protéines orthologues de PorA et PorH ont été décrites chez différentes corynebactéries : *C. efficiens*, *C. callunae*, *C. diphtheriae* (Tableau 9) (Barth *et al.*, 2010; Hunten *et al.*, 2005a; Hunten *et al.*, 2005b; Lichtinger *et al.*, 2001; Schiffler *et al.*, 2007). Connaissant la masse théorique de ces protéines dans les différentes espèces, nous avons souhaité, dans un premier temps, analyser par spectrométrie de masse les extraits protéiques de *C. efficiens* YS-314 et *C. diphtheriae* ATCC11913. La présence d'un acide mycolique sur ces protéines dans ces espèces entraînerait un incrément de masse. Il faut noter que chez *C. diphtheriae* les acides corynomycoliques majoritaires sont du C30:0 ( $\Delta m=450$ ) et C32:0 ( $\Delta m=478$ ) tandis que pour *C. efficiens* ce sont des C32:0 ( $\Delta m=478$ ) et C34:1 ( $\Delta m=504$ ) (Puech *et al.*, 2001). L'analyse par MALDI-TOF des deux extraits montre, pour les deux extraits, la présence de pics pouvant correspondre à la masse de PorA mycoloylée. En effet, chez *C. efficiens*, la masse théorique de PorA est de 4610 ; or sur le spectre, nous observons des pics à  $m/z$  5114 et 5143 pouvant correspondre à PorA avec un C32:0 et C34:1, respectivement. De même pour *C. diphtheriae*, nous observons des pics de  $m/z$  5178 et à 5205 correspondant, respectivement, aux masses de PorA avec un C30:0 et un C32:0.

Souches	Séquence	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire	M+Na <sup>+</sup> avec un acide mycolique
PorA <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	MENVYEFGLNLDVLSGSLIGYVDFDLGASSKWAGAVADLIGLLG	45	4680	C32:0 = 5181 C34:1 = 5207
PorA <i>C. efficiens</i> YS-314	MESITDFLANVSNLSSTGLVGTVFGLLKTAGDWADNVAKLLGLLG	45	4610	C32:0 = 5111 C34:1 = 5127
PorA <i>C. diphtheriae</i> ATCC11913	MQNIENWVALSTDENSIVTVIFDLLKQVAKMGKAIADLIGLAK	43	4702	C30:0 = 5175 C32:0 = 5203
PorA <i>C. callunae</i> ATCC15991	MDNFVEFLDNVNTLSSTGLVAELLDFFASGKWAGAVADLLGLVK	45	4790	C32:0 = 5291 C34:1 = 5317
PorH <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	MDLSLLKETLGNYETFGGNIGTALQSIPTLLDSILNFFDNFGDLADTTGENLDFSS	57	6161	C32:0 = 6662 C34:1 = 6688
PorH <i>C. efficiens</i> YS-314	MDLSLLKDSLDFATLGKNLGPALQGIPTLLNSIIAFFQNFGLAETTGAAGNLSS	57	5885	C32:0 = 6386 C34:1 = 6412
PorH <i>C. diphtheriae</i> ATCC11913	MDIQFIASQLKHFDTFVTSIVDLFQGFNLIADLADLFKNNAAGWGDTWEETKKIFENK	59	6780	C30:0 = 7253 C32:0 = 7281
PorH <i>C. callunae</i> ATCC15991	MDLSLLADNLDYSTFGGNIGTALTMIPDLLKGIIAFFENFGDNADATSAAFEGLSS	57	5962	C32:0 = 6463 C34:1 = 6489

**Tableau 9 :** Séquences de PorA et PorH de différentes espèces de corynébactéries.



**Figure 50 :** A) Spectre de masse d'un extrait protéique de *C. efficiens* obtenu en MALDI-TOF mode linéaire positif; B) Spectre de masse d'un extrait protéique de *C. diphtheriae* obtenu en MALDI-TOF mode linéaire positif. Tous les ions sont des adduits sodium  $[M+Na]^+$

Ces premiers résultats montrent la présence de PorA mycoloylée chez d'autres espèces de corynébactéries.

La recherche par homologie de la protéine X n'a pas permis d'identifier d'orthologues chez d'autres *Corynebacterineae*.

## VIII.2 Recherche de protéines homologues à cMytC

Une autre approche est de rechercher la présence de protéines orthologues à cMytC ayant une grande boucle d'insertion (15-20 résidus) et des mutations au niveau des acides aminés dont la chaîne latérale est impliquée dans la fixation du substrat (D106N, R109D, S315K, S316C, K319D) dans les autres *Corynebacterineae*. En effet, ayant démontré que cMytC est la mycoloyltransférase impliquée spécifiquement dans la modification post-traductionnelle des petites protéines chez *C. glutamicum*, l'identification d'orthologues à cette enzyme avec les mêmes caractéristiques serait un argument en faveur de la présence de protéines mycoloylées chez d'autres bactéries.

Pour cela, nous avons effectué, à partir de la séquence protéique de cMytC, une recherche de protéines orthologues à l'aide du programme BLASTP du NCBI restreint uniquement aux *Corynebacterineae*.

Des orthologues de cMytC sont retrouvés chez différentes corynébactéries avec un score élevé dont en particulier la protéine CE0356 de *C. efficiens* avec un recouvrement de 99% et la protéine DIP0365 de *C. diphtheriae* avec un recouvrement de 98%. Ceci confirme l'identification de PorA mycoloylée chez ces deux espèces.

Cette analyse a permis aussi d'identifier des protéines orthologues à cMytC, chez *Nocardia farcinica* IFM10152 avec la protéine nfa7210 et chez *Gordonia bronchialis* avec la protéine Gbro0876. Dans toutes les *Rhodococcus* séquencées, deux protéines orthologues à cMytC sont retrouvées dont les protéines RER15360 et RER15370 chez *Rhodococcus erythropolis* PR4 (Tableau 10A). Aucune protéine orthologue à cMytC n'a été retrouvée chez les mycobactéries avec cette méthode.

A)

	cmytC	
	Coverage	E-value
<b>CE0356</b>	99%	0
<b>DIP0365</b>	98%	3 <sup>E</sup> -116
<b>RER15360</b>	96%	4 <sup>E</sup> -74
<b>RER15370</b>	80%	2 <sup>E</sup> -75
<b>nfa7210</b>	81%	3 <sup>E</sup> -71
<b>Gbro0876</b>	77%	3 <sup>E</sup> -62

B)

	cmytC	
	Coverage	E-value
<b>cMytA</b>	72%	3 <sup>E</sup> -30
<b>cMytB</b>	76%	3 <sup>E</sup> -22
<b>cMytD</b>	79%	7 <sup>E</sup> -36
<b>cMytE</b>	84%	4 <sup>E</sup> -60
<b>cMytF</b>	84%	4 <sup>E</sup> -59

C)

	cmytF	
	Coverage	E-value
<b>cMytC</b>	84%	2 <sup>E</sup> -62
<b>CE0356</b>	65%	4 <sup>E</sup> -65
<b>DIP0365</b>	60%	2 <sup>E</sup> -58
<b>Gbro0876</b>	63%	2 <sup>E</sup> -44
<b>RER15360</b>	60%	8 <sup>E</sup> -55
<b>RER15370</b>	60%	2 <sup>E</sup> -55
<b>nfa7210</b>	60%	1 <sup>E</sup> -47

**Tableau 10 :** A) Homologie entre cMytC de *C. glutamicum* ATCC13032 et des protéines de différentes *Corynebacterineae* obtenue par BLASTP. B) Homologie entre les différentes mycoloyltransférases de *C. glutamicum* ATCC13032 obtenue par BLASTP. C) Homologie entre cMytF de *C. glutamicum* ATCC13032 et les protéines de différentes *Corynebacterineae* putatives homologues à cMytC obtenue par BLASTP.

Afin de vérifier la spécificité de cette homologie, nous avons effectué une nouvelle recherche par BLASTP avec la mycoloyltransférase la plus proche d'un point de vue séquence de cMytC chez *C. glutamicum* : cmytF qui possède une boucle d'insertion de 15 acides aminés (Tableau 10B). Les scores obtenus pour les protéines précédentes (CE0356, DIP0365, Gbro0876, RER15360, RER15370, nfa7210) sont résumés dans le Tableau 10C. Nous remarquons que l'ensemble de ces protéines ont une homologie plus faible avec cMytF qu'avec cMytC. En effet, le recouvrement est plus faible ce qui confirme l'homologie spécifique à cMytC des différentes protéines.

Nous avons effectué un alignement de séquences des protéines CE0356, DIP0365, Gbro0876, RER15360, RER15370, nfa7210 avec cMytC. Pour l'ensemble de ces protéines nous remarquons la présence d'une boucle d'insertion en amont de l'acide glutamique catalytique ainsi que les mutations au niveau du site de fixation au tréhalose (Figure 51).

La présence d'orthologues à cMytC nous laisse penser que des protéines mycoloylées seraient présentes chez d'autres *Corynebacterineae*.

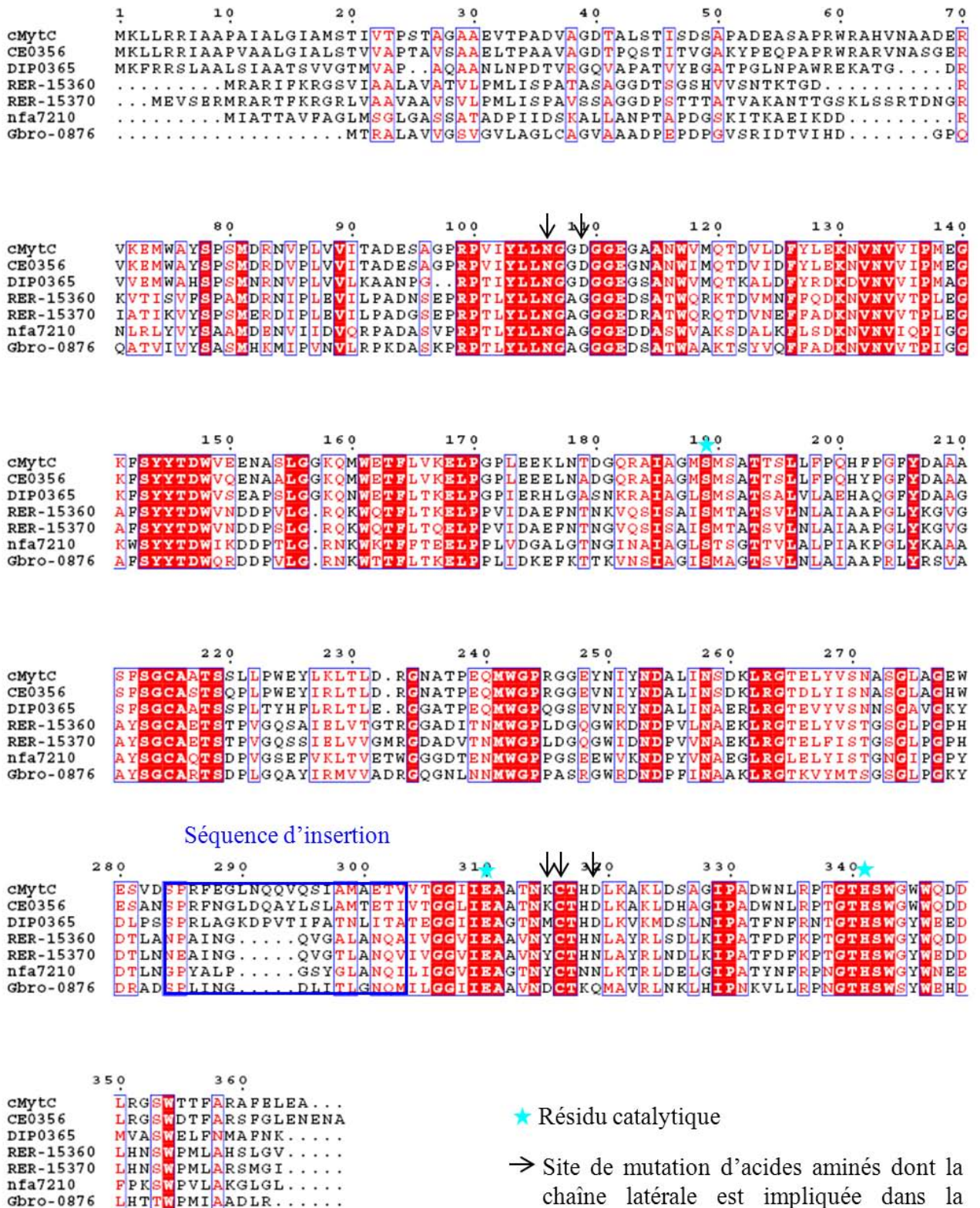


Figure 51 : Alignement de cMytC avec des protéines orthologues de différentes *Corynebacterineae* (CE : *C. efficiens*, DIP : *C. diphtheriae*, RER : *R. erythropolis*, nfa : *N. farcinica*, Gbro : *G. bronchialis*)



## Chapitre IX Conclusions et perspectives

Les *Corynebacterineae* sont des bactéries caractérisées par la présence d'une enveloppe atypique pour des bactéries Gram<sup>+</sup>, avec notamment la présence d'une membrane externe appelée mycomembrane. Cette membrane est constituée majoritairement d'acides mycoliques que l'on retrouve soit liés à l'arabinogalactane formant le feuillet interne soit au tréhalose formant le feuillet externe. Dans la plupart des genres de ce sous-ordre, il a été mis en évidence la présence de protéines au niveau de la mycomembrane dont en particulier les mycoloyltransférases responsables du transfert des acides mycoliques sur leur accepteurs finaux mais aussi la présence de porines permettant le passage des solutés hydrophiles.

Au cours de ce travail, nous avons montré l'existence, chez *C. glutamicum* ATCC13032, de nouveaux accepteurs d'acides mycoliques de nature non osidique, des petites protéines de masse moléculaire inférieure à 10 kDa, PorA, PorH et la protéine X. Nous avons mis en évidence que ces trois petites protéines sont modifiées post-traductionnellement par un acide mycolique. PorA et PorH sont décrites comme étant des protéines qui s'oligomérisent afin de former un pore cation-sélectif avec une activité de 2,5 nS (Barth *et al*, 2010). A l'heure actuelle, aucune activité particulière n'a été déterminée pour la protéine X. L'identification et la caractérisation de cette modification post-traductionnelle ont été effectuées grâce à différentes techniques de biochimie comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF, la chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse, des traitements chimiques ou bien de biologie moléculaire. Pour les trois protéines, nous avons montré qu'elles étaient *O*-acylées, modification post-traductionnelle jamais rencontrée chez les bactéries. En effet, les *O*-acylations jusqu'à cette étude, n'ont été décrites que chez les mammifères en particulier sur la protéine Wnt-3a et la ghréline.

Différents types de modifications par les lipides sont décrits (Nadolski & Linder, 2007). On retrouve, pour les plus répandues, les modifications de cystéines par des acides palmitiques, des groupements prényl (farnesyl et géranylgeranyl) et des diacylglycérols dans le cas des lipoprotéines ou encore la modification de l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale par des acides myristiques. Une autre modification bien caractérisée est l'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) au niveau de l'extrémité C-terminale de certaines protéines. Ces modifications jouent un rôle important dans la localisation et la fonction des protéines. Par exemple, chez les

bactéries Gram<sup>-</sup>, l'acylation en position N-terminale a un rôle prépondérant dans la localisation des protéines au niveau de la membrane externe comme pour la lipoprotéine de Braun chez *E. coli* (Braun, 1975; Sankaran & Wu, 1994). Chez les eucaryotes, les modifications lipidiques sont impliquées dans la transduction du signal, l'embryogénèse, ou le trafic des protéines à travers les voies de sécrétion...

Chez les eucaryotes, la *O*-acylation a un rôle différent selon la protéine. La protéine Wnt-3a est une protéine qui joue un rôle clé dans l'embryogénèse. Il s'agit d'une protéine sécrétée impliquée dans la transmission du signal. Cette protéine est composée de 352 acides aminés et possède deux modifications post-traductionnelles, une *S*-palmitoylation de la cystéine 77 et une *O*-acylation par un acide palmitique de la sérine 209. L'étude d'un mutant ponctuel de la cystéine 77 en alanine a montré, malgré une sécrétion normale de la protéine, une absence de fixation sur son récepteur empêchant ainsi la transduction du signal. La *S*-palmitoylation a un rôle sur l'activité de la protéine Wnt-3a. Par contre, la mutation de la sérine 209 a permis de montrer que la *O*-acylation était impliquée spécifiquement dans la sécrétion et le trafic de la protéine (Takada *et al*, 2006; Willert *et al*, 2003).

L'autre protéine *O*-acylée très étudiée est la ghréline. Il s'agit d'un peptide hormonal de 28 acides aminés acylé par un acide octanoïque au niveau de la sérine en position 3. Suivant l'espèce, l'acide aminé en position 3 peut être aussi une thréonine. Cette hormone se fixe sur un récepteur spécifique appelé « Orphan G-protein coupled receptor » (GHS-R1a) stimulant la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse. Elle est aussi très étudiée pour son rôle dans la stimulation de l'appétit. Dans le cas de la ghréline, l'acide octanoïque est essentiel à son activité et non à sa localisation (Kojima *et al*, 1999).

Dans le cas des protéines PorA et PorH, nous avons montré que l'absence de mycoloylation avait un impact sur l'activité de l'hétéroooligomère *in vitro*. Mais cette modification est-elle nécessaire sur les deux protéines pour l'activité porine ? Pour cela, une étude de l'activité par BLM pourrait être effectuée à partir de protéines PorA et PorH purifiées à l'aide d'une étiquette histidine avec ou sans acide mycolique. Une collaboration a été établie pour répondre à ces questions entre Alexandre Ghazi (IBBMC, Université Paris-Sud11-Orsay) et l'équipe « RMN et Interactions Protéines – Membranes » dirigée par le Pr A. Milon dans le cadre de la thèse de Parthasarathi Rath. Cependant, il existe plusieurs hypothèses pour le rôle de la *O*-acylation *in vivo* :

- L'acide mycolique permettrait une structuration correcte de l'hétéroooligomère au sein de la mycomembrane. Une réponse à cette hypothèse pourra être apportée par l'étude

structurale des protéines PorA et PorH par RMN. Ce travail est actuellement en cours au sein de l'équipe du Pr A.Milon.

- L'acide mycolique serait impliqué dans l'adressage des protéines au niveau de la mycomembrane.

- L'acide mycolique permettrait l'ancrage des protéines au niveau de la mycomembrane. Ces deux dernières hypothèses pourraient être vérifiées grâce à une méthode de séparation et purification de la mycomembrane mise au point dans l'équipe du Pr. N. Bayan (non publiée). L'analyse comparative par spectrométrie de masse des protéines extraites de la mycomembrane issues de la souche sauvage et du mutant d'interruption *cmytC* permettrait de voir si la localisation est liée à la modification au niveau de la membrane externe.

Cette étude a permis d'identifier une troisième petite protéine mycoloylée, la protéine X, dont la fonction est inconnue. Il s'agit d'un peptide de 38 acides aminés codé par le gène *cg2875*. L'obtention du mutant de délétion  $\Delta cg2875::km$  (souche CGL2060) montre que la protéine X n'est pas essentielle. Nous souhaiterions, sur ce mutant, effectuer une analyse phénotypique approfondie afin de comprendre le rôle de cette protéine comme par exemple des expériences de mesure de perméabilité à différents composés ou de regarder l'expression de la protéine dans des conditions de culture différentes. Afin de confirmer l'attribution du gène *cg2875*, il est nécessaire de compléter la souche CGL2060 par le gène natif. Une étude d'activité de la protéine X par BLM pourrait être faite à partir de la protéine purifiée seule ou associée avec PorA ou PorH mais ceci nécessite la maîtrise de l'expression de cette protéine chez *C. glutamicum*. PorA et PorH étant retrouvées chez d'autres corynébactéries, *C. efficiens*, *C. callunae*, *C. diphtheriae*, nous pourrions effectuer une recherche d'orthologues de la protéine X dans ces espèces.

Nous avons identifié l'acide aminé modifié seulement pour la protéine PorA, la sérine 15. Nous souhaiterions localiser la modification post-traductionnelle sur PorH et sur la protéine X également sur les orthologues de PorA et PorH chez *C. efficiens*, *C. callunae*, *C. diphtheriae*. Une approche par mutagénèse dirigée pourrait être envisagée comme pour PorA et PorH de *C. glutamicum*. Pour la protéine PorH de *C. glutamicum*, ayant maintenant la possibilité de la purifier à l'aide d'une étiquette histidine, une nouvelle étude par spectrométrie de masse MS-MS pourrait être tentée en parallèle de l'étude structurale par RMN. L'ensemble de ces résultats permettrait peut-être d'identifier une séquence consensus pour la *O*-mycoloylation.

L'ensemble des protéines mycoloylées identifiées chez les corynébactéries sont des petits peptides de taille allant jusqu'à 60 acides aminés. La *O*-mycoloylation est-elle spécifique de petites protéines ? Pour identifier de nouvelles protéines mycoloylées, nous proposons de cultiver les cellules en présence de [1-<sup>14</sup>C]-palmitate afin de marquer l'ensemble des dérivés acylés des cellules. Sachant que les protéines mycoloylées se trouvent au niveau de l'enveloppe, des extraits d'enveloppe seront analysés sur gel SDS-PAGE de différents pourcentages en acrylamide/bisacrylamide afin de visualiser l'ensemble des protéines avec une bonne résolution. Le problème est que les bactéries possèdent des lipoprotéines au sein de leur enveloppe. Les lipoprotéines se caractérisent par une *N*-acylation de la cystéine *N*-terminale et la présence d'un diacylglycérol sur la fonction thiol de cette cystéine. La biosynthèse des lipoprotéines se déroule en trois étapes. La première est catalysée par une pré-prolipoprotéine diacylglycérol transférase appelé *Lgt* permettant la fixation d'un diacylglycérol sur la lipobox puis intervient une prolipoprotéine signal peptidase (*LspA*) clivant le peptide signal en amont de la cystéine. La dernière étape permet la fixation d'un acide gras en position *N*-terminale de la cystéine grâce à une apolipoprotéine *N*-acyltransférase (*Lnt*) (Rezwan *et al*, 2007). Lors du marquage au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate, les lipoprotéines seront marquées de la même façon que les protéines mycoloylées. Afin de différencier ces deux types de protéines, nous effectuerons cette expérience sur la souche *cmytC* ne produisant plus de protéines mycoloylées et la souche *lgt* ne produisant plus de lipoprotéines (non publié). L'analyse comparative des gels entre la souche sauvage, le mutant *cmytC* et le mutant *lgt*, après révélation par autoradiographie, devrait permettre de différencier les protéines mycoloylées des lipoprotéines et ainsi d'identifier sans ambiguïté les protéines mycoloylées. Les protéines mycoloylées visualisées après marquage pourraient être ensuite identifiées par protéomique à partir de cellules non marquées.

L'interruption du gène *cg0413* codant pour la protéine cMytC a permis de mettre en évidence que cette protéine est impliquée spécifiquement dans le transfert de l'acide mycolique sur les protéines. En effet, les expériences de complémentation effectuées avec le plasmide codant pour la protéine cMytC mutée et avec une étiquette histidine ou par le plasmide codant pour cMytA ne permettent pas de restaurer la mycoloylation des protéines, seule la complémentation par le plasmide codant pour la protéine cMytC sauvage permet à nouveau d'obtenir des protéines avec la modification post-traductionnelle. L'analyse du mutant *cmytC* montre une absence de mycoloylation des protéines et une accumulation du MMT. Ceci nous permet de proposer que la mycoloylation des protéines s'effectue par l'intermédiaire du MMT

comme pour la formation du DMT et de l'arabinogalactane mycoloylé. En effet, grâce à des expériences de marquage au [1-<sup>14</sup>C]-acétate, les composés à acides mycoliques ont été suivis au cours des différentes phases de croissance. Les auteurs ont démontré que le MMT était présent lors du début de la phase exponentielle puis qu'il disparaissait au cours du temps en faveur du DMT et de l'arabinogalactane mycoloylé (Puech *et al*, 2000). Afin de démontrer que le MMT est le donneur d'acide mycolique pour les protéines, nous envisageons de mettre au point un test *in vitro* avec la protéine cMytC purifiée en présence de MMT et d'un extrait de protéines non mycoloylées. Le suivi de la réaction se ferait par analyse des protéines PorA, PorH et la protéine X par MALDI-TOF. Une étude cinétique du marquage, comparable à celle effectuée sur l'AG et le DMT, sur PorA, PorH et la protéine X sera envisageable quand leur détection sur gel sera mise au point.

Nous avons observé, pour le mutant *cmytC*, un phénomène d'agrégation partielle qui est, dans le cas des mutants affectés dans la biosynthèse des constituants de l'enveloppe, signe d'une altération de la structure de l'enveloppe. Il serait donc intéressant d'étudier par microscopie électronique le mutant *cmytC*. Plusieurs études sont envisageables comme une étude par la technique de CEMOVIS qui permettrait de voir l'intégrité de la mycomembrane ou bien des expériences de cryomicroscopie électronique ou cryofracture.

L'identification de la mycoloyltransférase cMytC impliquée dans la modification post-traductionnelle nous a permis d'avoir une nouvelle approche, différente de la recherche d'orthologues de PorA et PorH, pour déterminer la présence de protéines mycoloylées chez d'autres *Corynebacterineae*. Malgré des séquences très similaires entre les mycoloyltransférases, cMytC possède certaines particularités comme une séquence d'insertion de 20 acides aminés et des mutations au niveau des acides aminés impliqués dans la liaison au substrat. Nous avons recherché dans l'ensemble du sous-ordre des *Corynebacterineae* des protéines orthologues ayant les caractéristiques de cMytC. Cela nous a permis d'identifier des protéines comparables à cMytC chez les genres *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia* et *Corynebacterium*. Un travail est actuellement en cours, en collaboration avec le Dr. C. Houssin, dont le but est de compléter la souche *cmytC* par les gènes codant pour les « cMytC » putatives des espèces sélectionnées (*R. erythropolis* PR4, *N. farcinica* IFM10152, *G. bronchialis*, *C. efficiens* YS-314 et *C. diphtheriae* Cr8(-)Tox<sup>-</sup> ainsi qu'avec les gènes codant pour les mycoloyltransférases chez *M. tuberculosis* (Ag85A, B, C, D). Les extraits protéiques des différents mutants complétés seront extraits en solvant organique puis analysés par MALDI-TOF. Si ces orthologues sont capables de compléter

la protéine cMytC, nous observerons les pics correspondant aux masses des protéines PorA, PorH et la protéine X mycoloylées. Ce résultat positif signifierait que les orthologues à cMytC jouent le même rôle dans leur souche d'origine et donc que ces bactéries possèderaient des protéines mycoloylées. La recherche de protéines mycoloylées pourrait se faire par marquage des cellules de ces différentes espèces avec du [1-<sup>14</sup>C]-palmitate. Le but serait de visualiser la libération éventuelle d'un acide mycolique après extraction et déacylation alcaline de l'extrait protéique, comme pour l'identification de la *O*-mycoloylation chez *C. glutamicum*.

De façon plus générale, les enzymes impliquées dans l'*O*-acylation de la protéine Wnt-3a et la ghréline ont été identifiées, respectivement la « porcupine » et la « Ghrelin *O*-acyltransferase » (Gutierrez *et al*, 2008; Takada *et al*, 2006; Yang *et al*, 2008). Elles appartiennent à la famille des « Membrane *O*-AcylTransferases » (MBOAT) permettant le transfert de longue chaîne d'acides gras sur des substrats hydroxylés associés aux membranes comme les phospholipides. Ces enzymes se caractérisent par des motifs caractéristiques dont un est retrouvé dans les « proteins *O*-acyltransferases », [WHGxxxGYxxxF]. Il serait intéressant de voir si la mycoloytransférase cMytC a des analogies avec les « proteins *O*-acyltransferases » et plus largement avec les MBOAT.

### **X.1 “*O*-mycoloylated proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria.”**

Huc E, Meniche X, Benz R, Bayan N, Ghazi A, Tropis M, Daffé M.  
**J Biol Chem.** 2010 Jul 16;285(29):21908-12. Epub 2010 May 27.

#### **Résumé**

*O*-acylation of proteins was known only in a few eukaryotic proteins but never in bacteria. We demonstrate, using a combination of protein chemistry and mass spectrometry, the occurrence of three *O*-acylated polypeptides in *Corynebacterium glutamicum*, PorA, PorH, and an unknown small protein. The three polypeptides are *O*-substituted by mycolic acids, long chain alpha-alkyl and beta-hydroxy fatty acids specifically produced by members of the *Corynebacterineae* suborder. To date these acids were described only as esterifying trehalose and arabinogalactan, and less frequently glycerol, important components of the highly impermeable outer barrier of *Corynebacterineae*. We show that the post-translational mycoloylation of PorA occurs at Ser-15 and is necessary for the pore-forming activity of *C. glutamicum*.

Cet article a été sélectionné dans le cadre de la « Faculty of 1000 in biology » par Priyanka Verma et Rajesh Gokhale (Faculty of 1000, 05 Oct 2010. F1000.com/5364957; FFactor 6 recommended)

## Article

**FFa**  
**6**

**O-mycoloylated proteins from  
Corynebacterium: an unprecedented  
post-translational modification in  
bacteria.**

Huc E, Meniche X, ..., Tropis M, Daffé M  
J Biol Chem. 2010 Jul 16; 285(29):21908-12

[Abstract](#) | [Full Text](#) | [Related Articles](#) | [Citations on Google Scholar](#) | [Order Article](#) 

 [Relevant Sections](#)

 [Export](#)

 [Email](#)

 [Add to MyF1000](#)

Post to   

## Comments

[Sign in](#) to leave a comment  
No comments yet.

## Evaluations

Evaluated by [Priyanka Verma](#) and [Rajesh Gokhale](#)

“ **This is a novel report giving evidence for the presence of O-linked acylated proteins in bacteria. This study shows modification of membrane-associated porin proteins with long chain mycolates, and gives a decisive role of this modification on the pore-forming activity of porins.** ”

Lipidation of protein molecules has been shown to be a crucial post-translational modification in both prokaryotic and eukaryotic systems. Lipidation not only acts as a mediator for membrane association but also as a determinant of specific protein-protein interactions and assembly of membrane protein complexes. Thioester and amide-linked acylation has been widely reported in many bacterial proteins, but this study is the first to demonstrate O-linked acylation of proteins in a bacterial system. By elegant use of protein chemistry and mass spectrometry-based tools, this report shows associations of O-linked long chain mycolates with Corynebacterium glutamicum porin proteins. This mycolation was mapped onto a serine residue and was shown to be conserved across many other Corynebacterium genomes. Mycolation of porins was also shown to be crucial for the pore-forming activity of these proteins. Interestingly, association of such long acyl chains with a protein molecule was, to date, unprecedented. However, the specific O-mycolyl transferases involved and role of this mycolation on membrane structure and stability still need to be addressed. Further, why nature chose to selectively modify these proteins using such long acyl chains still remains elusive.

Competing interests: None declared

 [Cite this evaluation](#)

Evaluated by:

[Priyanka Verma](#) and [Rajesh Gokhale](#)

National Institute of Immunology, India  
[Chemical Biology](#)  
05 Oct 2010

**Rating 6**  
Recommended



# O-Mycoloylated Proteins from *Corynebacterium*

## AN UNPRECEDENTED POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION IN BACTERIA\*

Received for publication, April 12, 2010, and in revised form, May 26, 2010  
Published, JBC Papers in Press, May 27, 2010, DOI 10.1074/jbc.C110.133033

Emilie Huc<sup>‡§1</sup>, Xavier Meniche<sup>‡§¶1</sup>, Roland Benz<sup>||</sup>, Nicolas Bayan<sup>¶</sup>,  
Alexandre Ghazi<sup>¶</sup>, Marielle Tropis<sup>‡§2</sup>, and Mamadou Daffé<sup>‡§3</sup>

From the <sup>‡</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 04, France, the <sup>§</sup>Université de Toulouse (Toulouse III), 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France, the <sup>¶</sup>Université Paris Sud-11, CNRS UMR8619, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, 91405 Orsay, France, and the <sup>||</sup>School of Engineering and Science, Jacobs-University Bremen, Campusring 1, D-28759 Bremen, Germany

**O-Acylation of proteins was known only in a few eukaryotic proteins but never in bacteria. We demonstrate, using a combination of protein chemistry and mass spectrometry, the occurrence of three O-acylated polypeptides in *Corynebacterium glutamicum*, PorA, PorH, and an unknown small protein. The three polypeptides are O-substituted by mycolic acids, long chain  $\alpha$ -alkyl and  $\beta$ -hydroxy fatty acids specifically produced by members of the Corynebacterineae suborder. To date these acids were described only as esterifying trehalose and arabinogalactan, and less frequently glycerol, important components of the highly impermeable outer barrier of Corynebacterineae. We show that the post-translational mycoloylation of PorA occurs at Ser-15 and is necessary for the pore-forming activity of *C. glutamicum*.**

Corynebacteria and related genera that compose the Corynebacterineae suborder are unique among Gram-positive bacteria by possessing, like Gram-negative microorganisms, two membranes in their cell envelope (1, 2). The outer membrane of corynebacteria contains long chain  $\alpha$ -alkyl and  $\beta$ -hydroxy fatty acids, known as mycolic acids (3, 4), and four specialized pore-forming proteins (porins), namely PorA, PorB, PorC, and PorH (5–7). We have recently shown, using recombinant PorA and PorH, that both PorA and PorH are required for the pore-forming activity of the major cell wall channels of *Corynebacterium glutamicum*, the prototype of amino acid producer bacteria used in industry, *Corynebacterium efficiens*, and *Corynebacterium diphtheriae* (8). The first porin characterized in corynebacteria is PorA from *C. glutamicum*, called CgPorA. This

45-amino acid-containing polypeptide (6) is an acidic protein with an excess of negatively charged amino acids, which explains the cation selectivity of the channel. Interestingly, a phenylthiohydantoin derivative of dehydroalanine was identified as a degradation product of serine at position 15 (see Fig. 1A) during the sequencing of CgPorA by Edman degradation (9). This observation strongly suggested a post-translational modification of this amino acid residue in CgPorA, possibly by a lipid in view of the unusual hydrophobicity of CgPorA and related porins, which are soluble in organic solvents.

The major types of lipid modification of proteins consist in the attachment of palmitoyl or myristoyl acyl chain, prenylation, cholesteryl, and glycosylphosphatidylinositol anchors. Most acylated proteins contain amide-linked myristic acid or thioester-linked palmitic acid residues (10). Besides, eukaryotic cells may also contain, although rarely, O-acylated proteins on serine or threonine residues because only a few such proteins are known to date (11), which include the growth hormone-releasing peptide ghrelin (12) and WntA, a protein that plays a key role in numerous aspects of embryogenesis (13). The present work addresses the question of the nature of the putative post-translational modification of PorA and its possible impact on the pore-forming activity of the protein.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Bacterial Strains and Culture Conditions**—*C. glutamicum* ATCC13032 was grown in either brain heart infusion (BHI,<sup>4</sup> Difco) medium or minimal medium with 4% sucrose as carbon source at 30 °C. The *Cgl* $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS* triple mutant, described by Wolf *et al.* (14), was grown only in minimal medium with 4% sucrose. The *pks13::km* (15), *fadD32::km* (16), and *accD4::km* (16) mutant strains of *C. glutamicum* were grown in BHI medium containing kanamycin at a final concentration of 10 mg/liter. The S15VPorA *C. glutamicum* mutant was grown in BHI supplemented with 10 mg/liter chloramphenicol. *C. diphtheriae* ATCC11913 and *C. efficiens* YS-314 were grown on BHI medium at 30 °C.

**Construction of the S15VPorA Mutant**—*porH* and *porA* genes are co-transcribed and are under the control of a predicted promoter located upstream *porH* (5). To substitute serine by valine at position 15 of the amino acid sequence of CgPorA, site-directed mutagenesis of *porA* was performed by overlap extension using the polymerase chain reaction (17). Two independent PCRs, PCR1a and PCR1b, were realized to generate the primary PCR products, using *C. glutamicum* chromosomal DNA as template. Both primary products contain the desired mutation as well as restriction sites at the beginning and end of the cloned sequence. For PCR1a and PCR1b, the primer pairs A and B and C and D were used, respectively (A, 5'-ATT-AGGATCCCGGCGTGCCAAAGGGG-3'; B, 5'-GGCCGG-AGCCGACAAGGACATCAAGGTTTCC-3'; C, 5'-TGAT-GTCCTTGTCGGCTCCGGCCTCATCGG-3'; D, 5'-ATT-

\* This work was supported by grants from the CNRS, the University of Toulouse (Paul Sabatier), and the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-07-BLAN-0363).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-561-175-567; Fax: 33-561-175-580; E-mail: marielle.tropis@ipbs.fr.

<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-561-175-569; Fax: 33-561-175-580; E-mail: mamadou.daffe@ipbs.fr.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: BHI, brain heart infusion; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight; WT, wild type.

ACCCGGGCGAGCCGTTGTAAAGTAG-3'). Mutagenic nucleotides included in the *porA*-coding sequence are underlined, and restriction enzyme sites introduced in primers are in bold letters, BamHI and XmaI, respectively. Then, both amplified products were hybridized and elongated to generate a 777-bp fragment (verified on agarose gel electrophoresis) consisting of *porH-porA* locus and 284 bp upstream *porH*. A second PCR was performed using primer pair AD, whose amplicons were ligated in pCGL482 using BamHI and XmaI, to generate pCGL482/S15V*porA-porH*. The construction was transformed in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain, and transformants were selected on LB plates containing chloramphenicol. The resulting plasmid, named pCGL482/S15V*porA-porH*, was verified by sequencing and transformed in *C. glutamicum* ATCC13032  $\Delta$ *porH-porA* mutant strain by electroporation to yield the mutant strain  $\Delta$ *porH-porA*(S15V*porA-porH*).

**Protein Extraction in Organic Solvents**—Cells were grown to an optical density at 600 nm of 10 and harvested by centrifugation. Then, the pellet was extracted with a mixture of chloroform:methanol (1:2, v/v) overnight at room temperature under stirring.

**Alkaline Treatment**—The chloroform:methanol extract (1 volume) was precipitated with diethyl ether (9 volumes) and kept overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The precipitated protein fraction was suspended in water (pH 3–4) and successively washed twice with chloroform and twice with diethyl ether until no traces of lipids (trehalose mono- and dimycolates, and free mycolic acids) were detected by thin-layer chromatography analysis. Then, the aqueous phase was de-O-acylated by 0.1 M NaOH at  $37^{\circ}\text{C}$  during 30 min. The reaction mixture was then acidified with stoichiometric quantities of acetic acid. The resulting fatty acids were extracted with diethyl ether and converted into methyl esters with diazomethane. The aqueous phase was dialyzed to remove salts, and both the organic and the aqueous phases were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

**Mass Spectrometry Analysis**—MALDI-TOF spectra of proteins were acquired on a Voyager-DE STR mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) equipped with a pulsed nitrogen laser emitting at 337 nm; spectra were analyzed in the linear positive ion mode using an extraction delay time set at 100 ns and an accelerating voltage of 25 kV. Native and deacylated proteins were loaded onto a metal plate with sinapinic acid as a matrix.

MALDI-TOF spectra of corynomycolic acid methyl esters were acquired in reflectron mode with a Applied Biosystems 4700 analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) equipped with an Nd:YAG laser (wavelength 335 nm; pulse < 500 ps; repetition rate 200 Hz). A total of 2500 shots were accumulated in positive ion mode, and mass spectrometry data were acquired with default calibration for the instrument. Lipids were loaded onto a metal plate with dihydroxybenzoic acid as a matrix.

**Pore-forming Activity**—The precipitated protein fraction was resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8 buffer, and the channel-forming activity was measured using black lipid bilayer membranes formed as described previously (18). Membranes were formed across the hole with a surface area of about  $0.5\text{ mm}^2$  by painting on a 1% solution of a mixture (molar ratio 4:1) of

diphytanoyl phosphatidylcholine and phosphatidylserine (Avanti Polar Lipids) in *n*-decane.

## RESULTS AND DISCUSSION

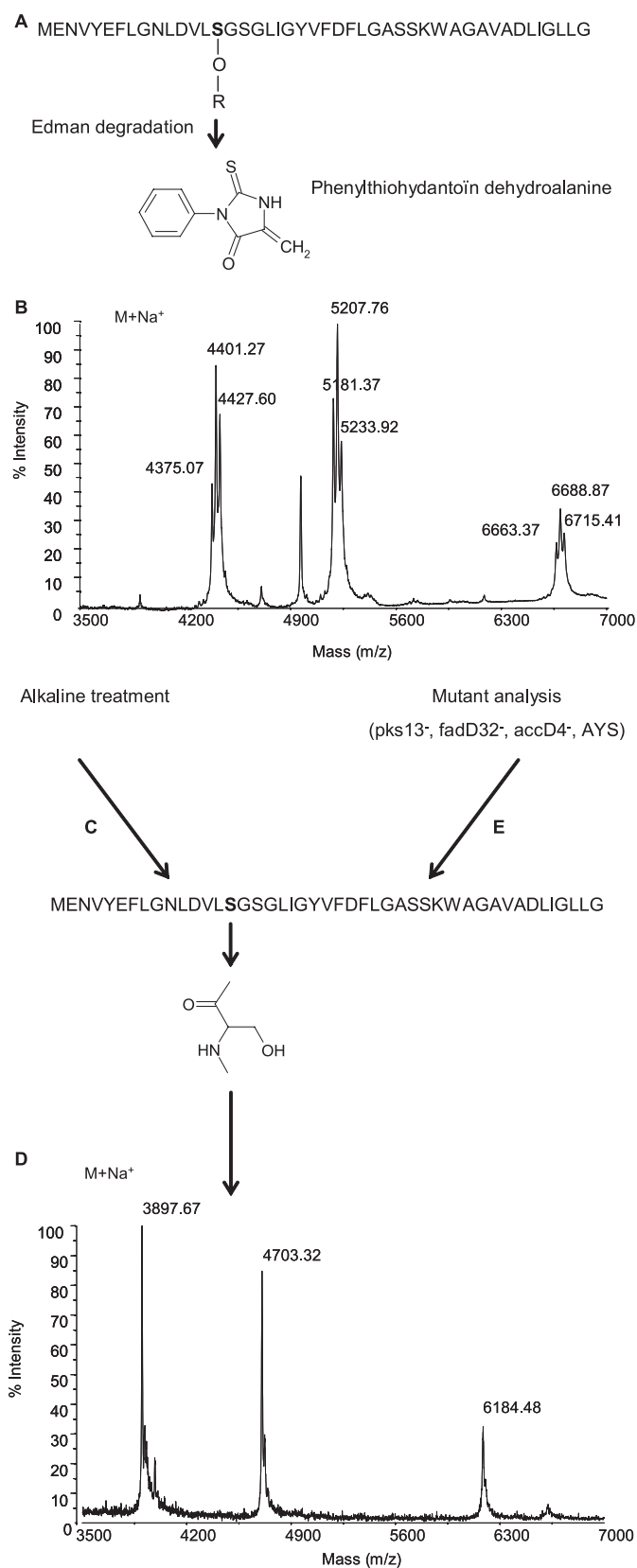
**Demonstration of a Post-translational Modification of CgPorA and CgPorH by Mass Spectrometry**—We first determined the masses of CgPorA and CgPorH by MALDI-TOF mass spectrometry of the porin-enriched organic extract (7). Although the predicted masses of the unmodified proteins are, respectively, 4680 Da ( $M+H^+ = 4681$ ;  $M+Na^+ = 4703$ ) and 6161 Da ( $M+H^+ = 6162$ ;  $M+Na^+ = 6184$ ), no peaks were observed at these mass values. Interestingly, the MALDI-TOF mass spectrum of the hydrophobic protein extract of *C. glutamicum* (Fig. 1B) showed three series of ion peaks centered at  $m/z$  4401, 5207, and 6688. The same experiment conducted on the PorA-PorH double mutant (8) showed a complete disappearance of the two latter signals.

**Nature of the Post-translational Modification**—The shapes of the three series of mass peaks were suggestive of acylated compounds, with mass peaks differing by 26 atomic mass units. Accordingly, the protein extract of the wild-type *C. glutamicum* was treated with mild alkali using NaOH 0.1 M (Fig. 1C) and reanalyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 1D). Expectedly, ion peaks corresponding to the calculated molecular masses of CgPorA and CgPorH were readily observed, respectively, at  $m/z$  4703 and 6184. The remaining series, centered at  $m/z$  4401, also shifted at  $m/z$  3897, indicating that the three polypeptides are alkali-labile. The latter compound, which was not assignable to any of the known polypeptides, is thereafter called protein X.

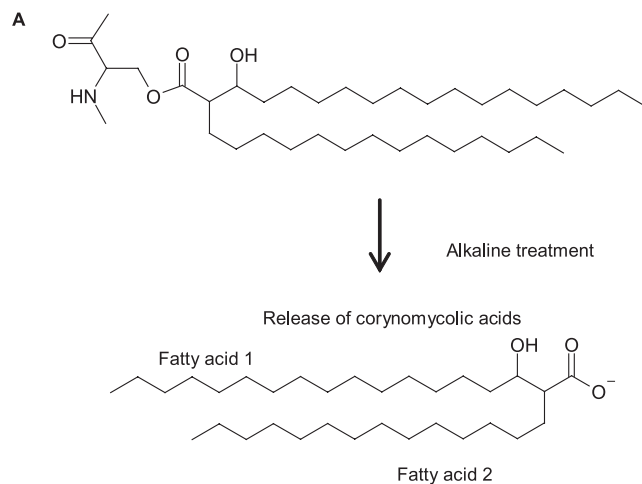
**Identification of the Acyl Substituents of CgPorA, CgPorH, and Protein X**—Remarkably, the mass peaks of the three series of native molecules were shifted by 478, 504, or 530 Da upon alkaline treatment, which may correspond to masses of C32:0, C34:1, or C36:2 corynomycolic acyl residues. Importantly, the 26-Da difference between the peaks of the native polypeptides, e.g. 5181, 5207, and 5233, perfectly matches the natural occurrence of the three major corynomycolic acid species in *C. glutamicum*, namely C32:0, C34:1, and C36:2 (15, 19) (Figs. 1B and 2A).

To confirm these results, gas chromatography and MALDI-TOF analyses of the fatty acid derivatives released by the alkaline hydrolysis of the protein extract were performed; for this purpose, the alkali-treated protein precipitate was partitioned between diethyl ether and water and the organic phase was treated with diazomethane, to methylate any potential carboxylic acid group. Analysis of the mass spectra clearly identified a series of pseudomolecular ion ( $M+Na^+$ ) peaks assignable to those of corynomycolate methyl esters consisting of C32:0, C34:1, and C36:2 (Fig. 2B) and identified by gas chromatography analysis.

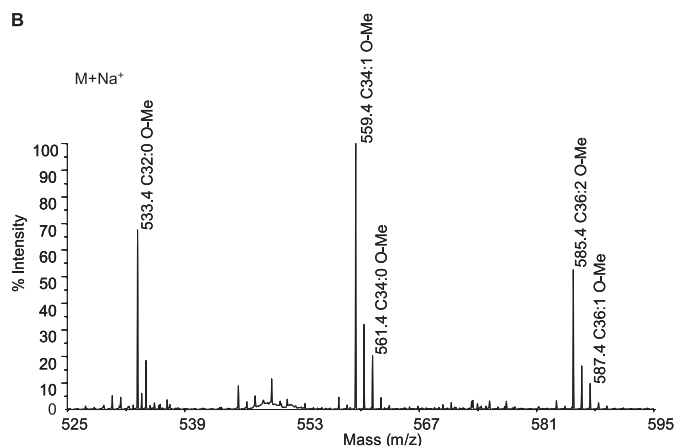
To further demonstrate the nature of the post-translational modification, proteins were extracted from *C. glutamicum* mutant strains known to be impaired in corynomycolic acid synthesis, namely *Cgl* $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS* (20), *pks13::km* (15), *fadD32::km* (16), and *accD4::km* (16) (Fig. 1E). The protein extracts were first analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Superimposable mass spectra were obtained for the differ-



**FIGURE 1. Identification of the mycoloylation of PorA.** *A*, primary structure and Edman degradation of PorA in *C. glutamicum* (CgPorA) wild type (WT). *R* = acyl residue. *B*, linear MALDI-TOF mass spectrum of the hydrophobic protein extract of *C. glutamicum* WT. *C* and *E*, alkali-treated CgPorA (*C*) and PorA from the mycolate-deficient strains of *C. glutamicum* Pks13<sup>-</sup>, FadD32<sup>-</sup>, AccD4<sup>-</sup>, and CglΔotsAΔtreYΔtreS (*E*) share the primary structure.



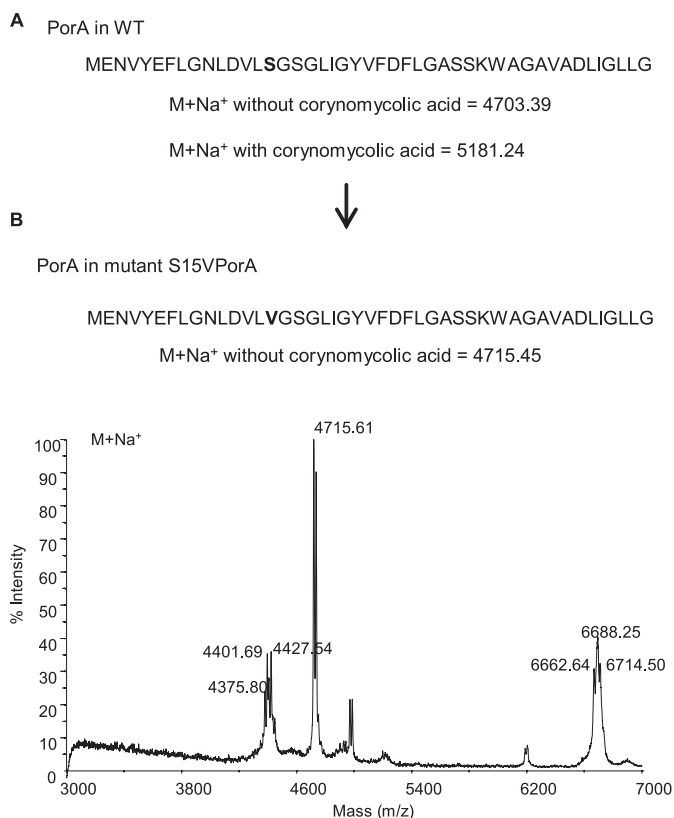
Corynomycolic acid	Condensation of fatty acids	
C32:0	C16:0	C16:0
C34:0	C16:0	C18:0
C34:1	C16:0	C18:1
C36:0	C18:0	C18:0
C36:1	C18:0	C18:1
C36:2	C18:1	C18:1



**FIGURE 2. Analysis of corynomycolic acids resulting from the alkaline treatment of the hydrophobic protein extract of *C. glutamicum*.** *A*, structures of the corynomycoloyl residue that substitutes the serine 15 in CgPorA and of the resulting putative free corynomycolic acids upon alkaline treatment of the hydrophobic polypeptides. These fatty acids are produced through an enzymatic condensation between two regular sized (saturated or monounsaturated) fatty acids (C16 or C18). *B*, reflectron MALDI-TOF mass spectrum of the corynomycolic acid methyl esters obtained by alkaline treatment, followed by methylation, of the hydrophobic proteins. The observed peaks correspond to those of pseudomolecular ions ( $M + Na^+$ ).

ent extracts and showed sharp pseudomolecular ion peaks at  $m/z$  3897, 4703, and 6184, corresponding to those observed in the spectrum of de-*O*-acylated protein extracts (Fig. 1D), rein-

*D*, linear MALDI-TOF mass spectrum of the hydrophobic protein extract of *C. glutamicum* WT after alkaline treatment or of Pks13<sup>-</sup>, FadD32<sup>-</sup>, AccD4<sup>-</sup>, or AYS mutant strains.



**FIGURE 3. Identification of the position of mycoloylation in CgPorA.** *A* and *B*, primary structure of CgPorA WT (*A*) and S15VPorA (*B*). The predicted pseudomolecular ( $M+Na^+$ ) masses of CgPorA, with and without a mycoloyl residue, are indicated. *B* also shows the linear MALDI-TOF mass spectrum of the hydrophobic protein extract of the *C. glutamicum* mutant S15VPorA.

forcing the demonstration that the three polypeptides are mycoloylated. Altogether, these data allowed us to (i) show the occurrence of an *O*-linkage cleaved by the alkaline conditions we used and (ii) identify corynomycolic acid as the lipid moiety that esterifies a hydroxyl group of an amino acid residue in CgPorA and at least two other proteins.

**Localization of the Site of the Post-translational Modification in CgPorA**—To unambiguously localize the modification in CgPorA, we first used the tandem mass spectrometry approach; all attempts in this direction were, however, unsuccessful. We then shifted to the site-directed mutagenesis strategy by constructing a S15VCgPorA mutant on the basis of the structure of the product (Fig. 1A) identified during the sequencing of CgPorA by Edman degradation (9). The MALDI-TOF mass spectrum of the S15VCgPorA hydrophobic protein extract showed the selective absence of the series at  $m/z$  5207 and the concomitant appearance of a peak at  $m/z$  4715 (Fig. 3), which corresponds to an up-shift of 12 Da (when compared with the calculated pseudomolecular mass of CgPorA, *i.e.* 4703 Da), the expected mass difference between the serine and the valine residues. Thus, these data conclusively established the modification site as Ser-15 of CgPorA.

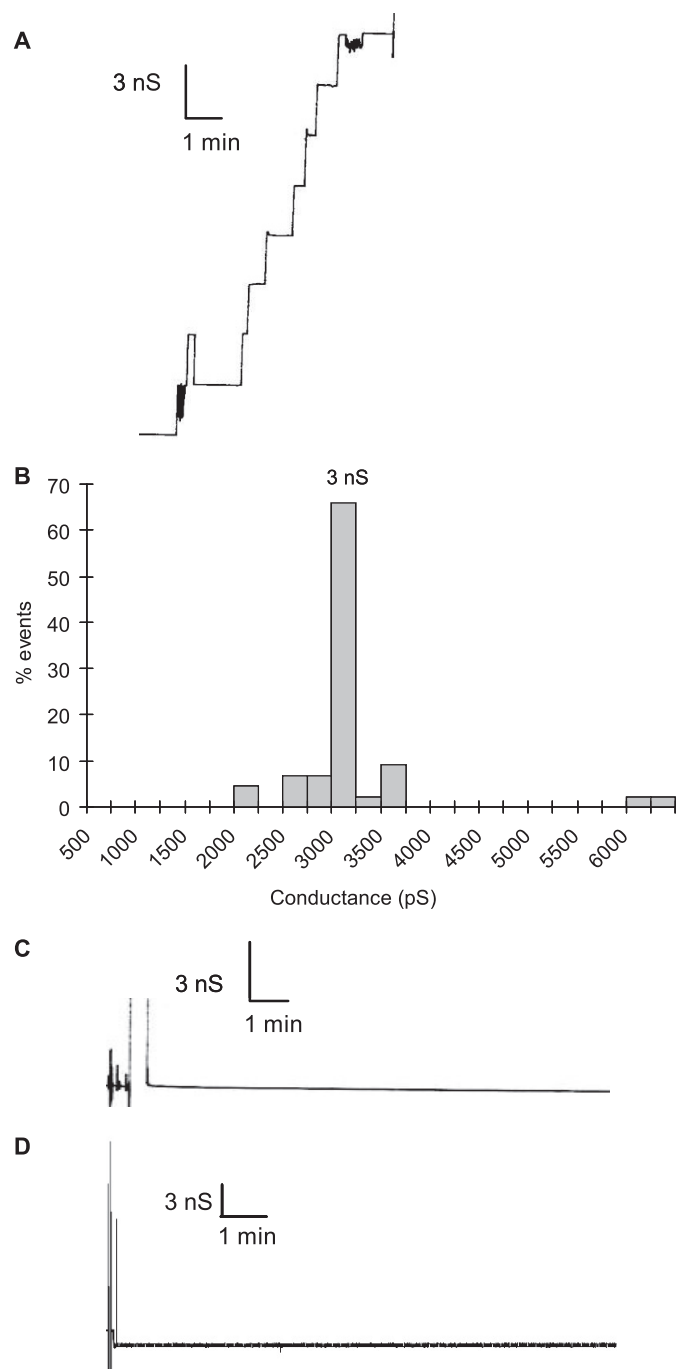
Similar experiments were also conducted to localize the site of *O*-mycoloylation in CgPorH. The tandem mass spectrometry strategy was again unsuccessful. In the absence of any obvious homology between the CgPorA and CgPorH, sequence alignment of the latter protein and its orthologues from

*C. diphtheriae* (21) and *C. efficiens* (8) showed that Thr-15 and Thr-48 are conserved in the proteins examined. Accordingly, T15ACgPorH and T48ACgPorH protein mutants were constructed and analyzed by MALDI-TOF mass spectrum. The polypeptides were found still *O*-mycoloylated, indicating that the acylation position of CgPorH differs from that of CgPorA.

***O*-Mycoloylated Proteins in Other Corynebacteria**—We previously showed that both *C. diphtheriae* (21) and *C. efficiens* (8) contain PorA orthologues, cdPorA and cePorA, respectively. To check that mycoloylation was not restricted to *C. glutamicum*, the hydrophobic protein-enriched fractions of the two latter corynebacterial species were isolated and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. The spectrum of the hydrophobic protein extracts from *C. diphtheriae* and *C. efficiens* showed pseudomolecular ion peaks corresponding to the predicted molecular masses of cdPorA and cePorA bearing the major corynomycoloyl residues of the species (22): 5175 (C30:0) and 5203 (C32:0) for cdPorA and 5111 (C32:0) and 5137 (C34:1) for cePorA. It was thus concluded that the cdPorA and cePorA are also acylated, likely with a corynomycoloyl residue.

**Impact of the Mycoloylation of CgPorA on the Pore-forming Activity**—We have recently shown that both CgPorA and CgPorH are required for the pore-forming activity of the major cell wall channel of *C. glutamicum* (8). The protein extract of the wild-type strain formed typical channels with a single conductance (3 ns in 1 M KCl) (Fig. 4, *A* and *B*). To determine the importance of the lipid moiety on the pore-forming activity, we measured the activity of the hydrophobic protein extracts of mutant strains completely devoid of mycolates, *i.e.* *Cgl*Δ*otsA*Δ*treY*Δ*treS* and *pks13::km*. No pore-forming activity could be detected in these extracts (Fig. 4C). Consistently, the pore-forming activity of extract from the wild-type strain was completely abolished upon de-*O*-acylation (Fig. 4D). To evaluate the specific role of mycoloylation of PorA, we analyzed CgPorA- and CgPorH-enriched protein extract isolated from the S15VCgPorA strain of *C. glutamicum*, which produced non-*O*-acylated PorA but *O*-mycoloylated PorH. Remarkably, no channel activity was observed when the standard concentration of protein extract (50 ng/ml) from the mutant was assayed; 5-fold more proteins were necessary to observe the formation of active channels. These data clearly demonstrated that the post-translational modification of CgPorA by a corynomycoloyl residue is necessary for the pore-forming activity.

The present work is the first demonstration of *O*-acylation of bacterial proteins, a post-translational modification that is required for the pore-forming activity of at least one of the modified polypeptides identified, namely CgPorA. These mycoloylated proteins represent a new class of mycolate-containing molecules in corynebacteria that were so far limited to acylated carbohydrate and glycerol. Several questions remain to be addressed, among which are (i) the identification of the unknown mycoloylated protein X; (ii) the sites of mycoloylation of both PorH and protein X; (iii) the specific *O*-mycoloyl transferases (23) that are involved in the mycoloylation of the proteins; (iv) the consequence of the lipid modification on the structure and stability of the outer membrane of the corynebacteria.



**FIGURE 4. Single-channel recording of a diphytanoyl phosphatidylcholine and phosphatidylserine (molar ratio 4:1)/*n*-decane membrane in the presence of hydrophobic protein extract of *C. glutamicum* WT or  $\Delta$ AYS. A, channel-forming activity of the protein extract from *C. glutamicum* WT. B, histogram of the percentage of events for the occurrence of a given conductivity unit, recorded for *C. glutamicum* WT. C and D, channel-forming activity of the *Cgl* $\Delta$ otsA $\Delta$ treY $\Delta$ treS mutant cultivated on minimal medium with 4% sucrose (C) and of the alkali-treated protein extract from *C. glutamicum* WT (D). The aqueous phase contained 1 M KCl (pH 6). The applied membrane potential was 20 mV; *T* = 20 °C.**

terial cell wall; and (v) the occurrence of *O*-acylation in other members of the *Corynebacterineae* suborder. Intensive efforts are currently devoted in our laboratories to answer these questions.

*Acknowledgment*—We thank Dr. Françoise Laval (IPBS, Toulouse) for help in mass spectrometry.

## REFERENCES

- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffé, M. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 5672–5680
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., and Engelhardt, H. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3963–3967
- Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63
- Daffé, M., and Draper, P. (1998) *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 131–203
- Hüntén, P., Costa-Riu, N., Palm, D., Lottspeich, F., and Benz, R. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1715**, 25–36
- Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Krämer, R., and Benz, R. (1998) *Biochemistry* **37**, 15024–15032
- Costa-Riu, N., Maier, E., Burkovski, A., Krämer, R., Lottspeich, F., and Benz, R. (2003) *Mol. Microbiol.* **50**, 1295–1308
- Barth, E., Barceló, M. A., Kläckta, C., and Benz, R. (2010) *J. Bacteriol.* **192**, 786–800
- Lichtinger, T., Riess, F. G., Burkovski, A., Engelbrecht, F., Hesse, D., Kratzin, H. D., Krämer, R., and Benz, R. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 462–469
- Nadolski, M. J., and Linder, M. E. (2007) *FEBS J.* **274**, 5202–5210
- Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., and Glaser, L. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 69–99
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999) *Nature* **402**, 656–660
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006) *Dev. Cell* **11**, 791–801
- Wolf, A., Krämer, R., and Morbach, S. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 1119–1134
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M., and Guilhot, C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 314–319
- Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Montrozier, H., Houssin, C., Stella, A., Lanéelle, M. A., Bardou, F., Guilhot, C., and Daffé, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8862–8874
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**, 51–59
- Benz, R., Janko, K., and Lauger, P. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **551**, 238–247
- Daffé, M. (2005) in *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (Lothar Eggeling, M. B., ed) pp. 121–148, Taylor and Francis Group A CRC Press Book, Boca Raton, FL
- Tropis, M., Meniche, X., Wolf, A., Gebhardt, H., Strelkov, S., Chami, M., Schomburg, D., Krämer, R., Morbach, S., and Daffé, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26573–26585
- Schiffler, B., Barth, E., Daffé, M., and Benz, R. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 7709–7719
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Lanéelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R., and Daffé, M. (2001) *Microbiology* **147**, 1365–1382
- Kacem, R., De Sousa-D'Auria, C., Tropis, M., Chami, M., Gounon, P., Leblon, G., Houssin, C., and Daffé, M. (2004) *Microbiology* **150**, 73–84



## **X.2“Partial redundancy in the synthesis of the D-arabinose incorporated in the cell wall arabinane of *Corynebacterineae*”**

Meniche X, de Sousa-d'Auria C, Van-der-Rest B, Bhamidi S, Huc E, Huang H, De Paepe D, Tropis M, McNeil M, Daffé M, Houssin C.

**Microbiology. 2008** Aug;154(Pt 8):2315-26.

### **Résumé**

The major cell wall carbohydrate of *Corynebacterineae* is arabinogalactan (AG), a branched polysaccharide that is essential for the physiology of these bacteria. Decaprenylphosphoryl-D-arabinose (DPA), the lipid donor of D-arabinofuranosyl residues of AG, is synthesized through a series of unique biosynthetic steps, the last one being the epimerization of decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose (DPR) into DPA, which is believed to proceed via a sequential oxidation-reduction mechanism. Two proteins from *Mycobacterium tuberculosis* (Rv3790 and Rv3791) have been shown to catalyse this epimerization in an in vitro system. The present study addressed the exact function of these proteins through the inactivation of the corresponding orthologues in *Corynebacterium glutamicum* (NCgl0187 and NCgl0186, respectively) and the analysis of their in vivo effects on AG biosynthesis. We showed that NCgl0187 is essential, whereas NCgl0186 is not. Deletion of NCgl0186 led to a mutant possessing an AG that contained half the arabinose and rhamnose, and less corynomycolates linked to AG but more trehalose mycolates, compared with the parental strain. A candidate gene that may encode a protein functionally similar to NCgl0186 was identified in both *C. glutamicum* (NCgl1429) and *M. tuberculosis* (Rv2073c). While the deletion of NCgl1429 had no effect on AG biosynthesis of the mutant, the gene could complement the mycolate defect of the AG of the NCgl0186 mutant, strongly supporting the concept that the two proteins play a similar function in vivo. Consistent with this, the NCgl1429 gene appeared to be essential in the NCgl0186-inactivated mutant. A detailed bioinformatics analysis showed that NCgl1429, NCgl0186, Rv3791 and Rv2073c could constitute, with 52 other proteins belonging to the actinomycetales, a group of closely related short-chain reductases/dehydrogenases (SDRs) with atypical motifs. We propose that the epimerization of DPR to DPA involves three enzymes that catalyse two distinct steps, each being essential for the viability of the bacterial cells.





## Partial redundancy in the synthesis of the D-arabinose incorporated in the cell wall arabinan of *Corynebacterineae*

Xavier Meniche,<sup>1</sup> Célia de Sousa-d'Auria,<sup>2,3</sup> Benoît Van-der-Rest,<sup>1†</sup> Suresh Bhamidi,<sup>4</sup> Emilie Huc,<sup>1</sup> Hairong Huang,<sup>4</sup> Diane De Paepe,<sup>1</sup> Marielle Tropis,<sup>1</sup> Mike McNeil,<sup>4</sup> Mamadou Daffé<sup>1</sup> and Christine Houssin<sup>2,3</sup>

### Correspondence

Christine Houssin  
christine.houssin@igmors.  
u-psud.fr

<sup>1</sup>Université Toulouse III (Université Paul Sabatier) et Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (UMR 5089), Département "Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes", 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse cedex 04, France

<sup>2</sup>Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France

<sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, F-91405 Orsay, France

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523-1682, USA

The major cell wall carbohydrate of *Corynebacterineae* is arabinogalactan (AG), a branched polysaccharide that is essential for the physiology of these bacteria. Decaprenylphosphoryl-D-arabinose (DPA), the lipid donor of D-arabinofuranosyl residues of AG, is synthesized through a series of unique biosynthetic steps, the last one being the epimerization of decaprenylphosphoryl-β-D-ribose (DPR) into DPA, which is believed to proceed via a sequential oxidation–reduction mechanism. Two proteins from *Mycobacterium tuberculosis* (Rv3790 and Rv3791) have been shown to catalyse this epimerization in an *in vitro* system. The present study addressed the exact function of these proteins through the inactivation of the corresponding orthologues in *Corynebacterium glutamicum* (NCgl0187 and NCgl0186, respectively) and the analysis of their *in vivo* effects on AG biosynthesis. We showed that NCgl0187 is essential, whereas NCgl0186 is not. Deletion of *NCgl0186* led to a mutant possessing an AG that contained half the arabinose and rhamnose, and less corynomycolates linked to AG but more trehalose mycolates, compared with the parental strain. A candidate gene that may encode a protein functionally similar to NCgl0186 was identified in both *C. glutamicum* (*NCgl1429*) and *M. tuberculosis* (*Rv2073c*). While the deletion of *NCgl1429* had no effect on AG biosynthesis of the mutant, the gene could complement the mycolate defect of the AG of the *NCgl0186* mutant, strongly supporting the concept that the two proteins play a similar function *in vivo*. Consistent with this, the *NCgl1429* gene appeared to be essential in the *NCgl0186*-inactivated mutant. A detailed bioinformatics analysis showed that NCgl1429, NCgl0186, Rv3791 and Rv2073c could constitute, with 52 other proteins belonging to the actinomycetales, a group of closely related short-chain reductases/dehydrogenases (SDRs) with atypical motifs. We propose that the epimerization of DPR to DPA involves three enzymes that catalyse two distinct steps, each being essential for the viability of the bacterial cells.

Received 4 January 2008

Revised 21 March 2008

Accepted 21 April 2008

†Present address: École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Avenue de l'Agrobiopole, BP 32607 Auzeville-Tolosane, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France.

**Abbreviations:** AG, arabinogalactan; Ara, arabinose; Ara<sub>f</sub>, arabinofuranosyl; DPA, decaprenylphosphoryl-D-arabinose; DPPR, decaprenyl-monophosphoryl-5-phosphoribose; DPR, decaprenyl-monophosphoryl-D-ribose; Gal, galactose; mAGP, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan; PAD, pulsed amperometric detector; ppRp, 5-phosphoribofuranose pyrophosphate; Rha, rhamnose; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; Suc, sucrose; TDCM, trehalose dicorynomycolate; TFA, trifluoroacetic acid; TMCM, trehalose monocorynomycolate.

Two supplementary tables, listing the primers used in this study and the orthologous group of proteins obtained by computational analysis using protein sequence alignments of strains examined in this study, are available with the online version of this paper.

## INTRODUCTION

The *Corynebacterineae* is a suprageneric actinomycetes group that includes the causative agents of the human diseases tuberculosis, leprosy and diphtheria, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* and *Corynebacterium diphtheriae*, respectively. The cell wall core of these bacteria is made up of an unusual matrix composed of a cross-linked peptidoglycan covalently bound to arabinogalactan (AG) chains, which in turn are linked to mycolic acids, allowing the attached lipids to form the inner leaflet of an outer membrane. This complex is often referred to as mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan (or mAGP) complex (Daffé & Draper, 1998).

Structural motifs of the AG polymer were first established for *M. tuberculosis* (Daffé *et al.*, 1990). However, except for some variations in glycosyl linkage compositions, notably in the arabinosyl portion, the major structural features of AG are conserved among all *Corynebacterineae* examined so far (Daffé *et al.*, 1993). In mycobacteria the polysaccharide is composed of two distinct regions: a homogalactan portion, composed of alternating 5-linked and 6-linked  $\beta$ -galactofuranosyl residues (Daffé *et al.*, 1990, 1993), which is covalently linked to the peptidoglycan via a disaccharide phosphate (McNeil *et al.*, 1990), and arabinan chains, formed from arabinofuranosyl (Araf) residues, attached to carbon 5 of some of the 6-linked galactosyl (Gal) residues (Daffé *et al.*, 1990) at their reducing termini (Besra *et al.*, 1995) and esterified with mycolic acids at their non-reducing termini (McNeil *et al.*, 1991). In addition to galactose (Gal) and arabinose (Ara), rhamnose (Rha) is also found in AG of *Corynebacterium glutamicum* (Alderwick *et al.*, 2005; Gebhardt *et al.*, 2007).

In the last few years an increasing number of studies have shown that *C. glutamicum* constitutes a good model for investigating biosynthetic pathways of specific cell wall compounds of *Corynebacterineae*, such as mycolic acids and AG. Indeed, while these components are essential for the viability of mycobacteria, *C. glutamicum* mutants either totally or severely deprived of mycolates or synthesizing a truncated AG devoid of the arabinan domain are viable, although they grow slowly (Alderwick *et al.*, 2005, 2006b; Portevin *et al.*, 2004, 2005; Tropis *et al.*, 2005).

The synthesis of the arabinan domain of AG results from the sequential addition of Araf residues to the galactan domain by specialized arabinosyltransferases such as Embs (Alderwick *et al.*, 2005; Escuyer *et al.*, 2001), AftA (Alderwick *et al.*, 2006b) and AftB (Seidel *et al.*, 2007). These enzymes utilize the unusual sugar donor decaprenylphosphoryl-D-arabinose (DPA) (Alderwick *et al.*, 2005; Wolucka *et al.*, 1994; Xin *et al.*, 1997), which has been shown to be the only donor for the Araf residues in both mycobacteria and corynebacteria. It has been demonstrated recently that DPA is synthesized from phosphoribose diphosphate (pRpp) (Scherman *et al.*, 1996) through an unusual series of three successive reactions (Mikusova *et al.*, 2005): (i) transfer of pRpp to decaprenyl phosphate to

form decaprenylphosphoryl-5-phosphoribose (DPPR); (ii) removal of the 5' phosphate giving decaprenylphosphoryl ribose (DPR); and (iii) epimerization of DPR to DPA, which likely occurs via a sequential oxidation-reduction mechanism involving an intermediate (DPX), product of DPR oxidation and precursor of DPA (Fig. 1). Although not unambiguously identified, DPX is probably a decaprenylphosphoryl-2-keto- $\beta$ -D-erythro-pentofuranose.

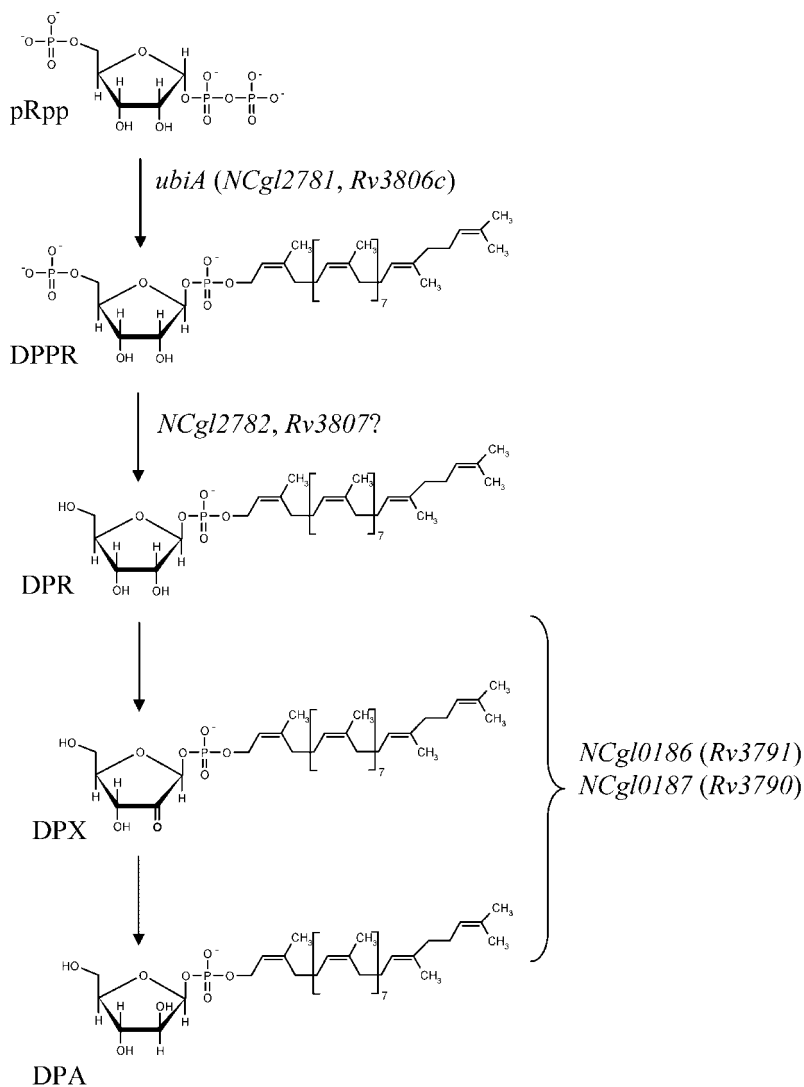
The only enzyme identified in the DPA biosynthesis pathway by gene inactivation and mutant analysis is the DPPR synthase, the product of the essential *M. tuberculosis* gene *Rv3806c* (Huang *et al.*, 2005), and named UbiA in *C. glutamicum* (Alderwick *et al.*, 2005). Inactivation of *ubiA* in this bacterium produces a mutant totally devoid of arabinan (Alderwick *et al.*, 2005). Very recently, on the basis of the similarity with proteins implicated in the arabinosylation of the *Azorhizobium caulinodans* nodulation factor, Mikusova *et al.* (2005) have proposed that *M. tuberculosis* genes *Rv3790* and *Rv3791*, which are both annotated as probable oxidoreductases, could encode the two enzymes expected to be involved in the epimerization of DPR into DPA. The two genes have been cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the corresponding proteins purified. The use of an *in vitro* assay has shown that the presence of both proteins is required to transform DPR to DPA, suggesting that the two proteins work in concert to catalyse the epimerization. It was thus interesting to address the question of the precise role of these enzymes in the biosynthesis of AG *in vivo*. As *Rv3790* and *Rv3791* are presumably essential in *M. tuberculosis* (Sasseti *et al.*, 2003) we attempted to delete their *C. glutamicum* orthologues, *NCgl0187* and *NCgl0186*, respectively, and characterize the resulting AG modifications.

## METHODS

**Strains and culture conditions.** *C. glutamicum* (ATCC 13032 RES167) (Dusch *et al.*, 1999) was cultured on Brain Heart Infusion (BHI) medium (Difco) at 30 °C. *E. coli* DH5 $\alpha$  and Top10 (Invitrogen) were used for the construction of plasmids and were grown on Luria-Bertani (LB) medium (Difco) at 37 °C. Ampicillin, kanamycin (Km), chloramphenicol (Cm) and sucrose (Suc) were added when required at final concentrations of 10, 25, 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 10% (w/v) (for *E. coli*), or 6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 10% (w/v) (for *C. glutamicum*), respectively. Transformation of *C. glutamicum* by electroporation was performed as described by Bonamy *et al.* (1990).

**DNA manipulations.** *C. glutamicum* chromosomal DNA was extracted as described by Ausubel *et al.* (1987). Oligonucleotide primers were synthesized by Genosys. All DNA sequencing was carried out by Cogenics.

**Construction of plasmids and strains.** In order to delete *NCgl0186* or *NCgl0187*, we used the strategy described by Schafer *et al.* (1994). In brief, two DNA fragments overlapping the gene to be deleted at its 5' and 3' extremities were amplified by PCR from *C. glutamicum* total DNA by using appropriate primers (186-1/186-2 and 186-3/186-4 for *NCgl0186*, and 187-1/187-2 and 187-3/187-4 for *NCgl0187*; see Supplementary Table S1) and cloned in the non-replicative vector pK18mobSac. The resulting plasmids (pK18mobsac $\Delta$ 186 and



**Fig. 1.** The biosynthetic pathway proposed for DPA synthesis from pRpp (Mikusova *et al.*, 2005). The isoprenoid moiety is drawn to conform to the structure of decaprenyl phosphate identified in mycobacteria. The structure of the corynebacterial equivalent is not known. Although the structure of DPX is not known with certainty, this intermediate is very likely a decaprenylphosphoryl-2-keto- $\beta$ -D-erythro-pentofuranose. The role of NCgl2782 (Rv3807c) in the dephosphorylation step is putative and arises from the position of the gene on the chromosome, just beside *ubiA* (Rv3806c), and from its annotation as a phosphatase.

pK18mobsac $\Delta$ 187) were sequenced and independently transferred into *C. glutamicum* ATCC 13032 RES167 by electroporation. Transformants in which the construct was integrated into the chromosome by single crossing over were selected on BHI plates containing Km. The second crossover event was selected by plating Km<sup>R</sup> clones on BHI plates containing Suc. Km<sup>S</sup> and Suc<sup>R</sup> colonies were screened by PCR for the correct deletion of the gene using primers binding upstream and downstream of the *NCgl0186* sequence. After verification of PCR products by sequencing, one strain carrying the *NCgl0186* deletion (Cg- $\Delta$ 186) was selected for further studies.

Construction of a mutant strain carrying a deletion of the *NCgl0187* gene was not successful. We thus tried to inactivate this gene. For this purpose, an internal fragment was amplified using primers 187-5 and 187-6 (see Supplementary Table S1) and cloned into plasmid pCR 2.1-TOPO using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) to give plasmid TOPO::187. This plasmid was used to electrotransform the ATCC 13032 RES167 strain. No transformant carrying the correct plasmid integration could be detected after selection on BHI plates containing Km and PCR analysis.

Deletion of the *NCgl1429* gene was done using a strategy described previously (Portevin *et al.*, 2004). In brief, two DNA fragments

overlapping the *NCgl1429* gene at its 5' and 3' extremities were amplified by PCR from *C. glutamicum* total DNA using primers 1429-AMXho/1429-AMSac and 1429-AVSac/1429-AVBgl, respectively (Supplementary Table S1). These fragments were inserted flanking a *km* resistance cassette into plasmid pMCS5 (MoBiTec). The resulting plasmid was transferred into *C. glutamicum* ATCC 13032 RES167 by electroporation, and transformants were selected on plates containing Km. Transformants in which allelic replacement had occurred were selected by PCR analysis using combinations of primers binding upstream and downstream of *NCgl1429* and in the *aphIII* sequences. After sequencing of the PCR products, one strain (Cg- $\Delta$ 1429) was selected for further studies.

For inactivation of *NCgl1429* in Cg- $\Delta$ 186, two plasmids were constructed. First, an internal fragment was amplified using primers 1429-1 and 1429-2 (see Supplementary Table S1) and cloned into plasmid pCR2.1-TOPO to give plasmid TOPO::1429. Then, a fragment corresponding to the entire *NCgl0186* ORF under the *ospB* promoter was amplified from plasmid pCGL2330 (see below), digested with *HindIII* and *SpeI*, and ligated to TOPO::1429 digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmids, TOPO::1429-cspB186 and TOPO::1429, were both used to electrotransform strain Cg- $\Delta$ 186, and transformants were selected

on BHI plates containing Km. Genomic DNAs from mutants were analysed by three PCR amplifications using two primers binding upstream of the 5' end and downstream of the 3' end of the *NCgl1429* gene, and the M13 forward and reverse primers binding in the pCR2.1-TOPO vector. The PCR products corresponding to the gene disruption borders were systematically sequenced.

Expression vectors encoding NCgl0186 (pCGL2330), Rv3791 (pCGL2331) and NCgl1429 (pCGL2333) were constructed using pCGL482 (Peyret *et al.*, 1993) as the cloning vector. We chose to clone these three ORFs under the control of the *csfB* promoter (Peyret *et al.*, 1993). Coding sequences from *C. glutamicum* ATCC 13032 chromosomal DNA were amplified by PCR using primer pairs 187-3/186-7 for *NCgl0186* and 1429-3/1429-4 for *NCgl1429*. The Rv3791 ORF was amplified using primers 3791-1 and 3791-2 from the pSTblue1-Rv3791 plasmid (Mikusova *et al.*, 2005). A DNA fragment containing the *csfB* promoter was generated using primers p*csfB*Bam and p*csfB*Nco and pCGL824 (Peyret *et al.*, 1993) as template DNA. All the amplicons were digested with the appropriate restriction endonucleases (see Supplementary Table S1). Plasmids were obtained by simultaneous ligation of fragments containing the *csfB* promoter, fragments containing one ORF and the appropriately digested pCGL482. Transformants were selected on Cm-containing plates.

**AG preparation.** Cell walls were prepared as described previously (Daffé *et al.*, 1990). Briefly, wet cells were resuspended in PBS buffer (50 mM, pH 7.2) at the concentration of 5 g in 20 ml and broken in a cell disrupter ( $2.7 \times 10^8$  Pa). After three cell disrupter cycles, intact cells were removed by centrifugation (3000 g) and the supernatant containing the cell walls was then centrifuged (27 000 g, 1 h). The resulting cell wall pellet was treated with aqueous 2% (w/v) SDS at 95 °C for 1 h and sedimented again at 27 000 g. This was followed by two acetone washes and the pellet thus obtained was mAGP. mAGP was further treated with 2 M NaOH and stirred gently at 80 °C for 16 h to remove the mycolic acid residues and cleave peptidoglycan to solubilize AG. The pellet was discarded and the pH of the supernatant was adjusted to 7.0 with glacial acetic acid. This neutralized AG was dialysed for at least 3–4 h with three 1 l changes of MilliQ water. The AG obtained was concentrated by rotary evaporation to a final volume of 1 ml, and was freeze-dried and stored till further use.

**Enzymic treatments of soluble AG.** The soluble AG was treated with partially purified endogenous arabinase (Dong *et al.*, 2006) at 37 °C for 12 h, followed by extraction with  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (10:10:3, by vol.). After centrifugation, the supernatant, which contained most of the released arabinans, was used for MALDI-TOF MS analysis.

To further elucidate the cell wall AG configuration, the soluble AG was treated with *Cellulomonas* arabinase obtained as described previously (McNeil *et al.*, 1994), which specifically releases Ara2 and Ara4 from AG.

**Analysis of AG.** The glycosyl composition of purified cell walls was determined by hydrolysing an aliquot of mAGP with 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 2 h at 110 °C, followed by trimethylsilylation (Sweeley *et al.*, 1963) and GC analysis of the resulting products, or by alditol acetate formation, as described previously (Daffé *et al.*, 1990).

HPLC analysis of soluble AG samples treated with arabinase was carried out on a Dionex system equipped with a CarboPac PA1 analytical column (4 × 250 mm). Total run time was 50 min, the NaOH concentration (100 mM) being consistent throughout. Sodium acetate concentration was varied from 0 to 450 mM for a period of 50 min. The eluted samples were detected using a pulsed amperometric detector (PAD).

For MALDI-TOF MS analysis, samples were peracetylated with acetic anhydride (100 µl) in the presence of pyridine (100 µl) at room temperature overnight and recovered after removal of the solvent in chloroform prior to MALDI-TOF MS. The acetylated AG samples were run in positive ion reflector mode on a Bruker Ultraflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). One microlitre of the sample was mixed with 1 µl matrix (10 mg ml<sup>-1</sup> dihydroxybenzoic acid in 50% acetonitrile/0.1% TFA) and allowed to air dry on the MALDI target plate.

For <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR analysis, AGs were solubilized in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (20 mg in 0.5 ml) and analysed at 600 and 150.9 MHz, respectively, on a Bruker Avance 600 MHz NMR spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. <sup>1</sup>H-decoupled <sup>13</sup>C spectra were obtained with a DEPT 135 pulse sequence in a DQD acquisition mode.

**Extraction and quantification of corynomycolic acids.** Lipids were extracted from wet cells for 16 h with  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2, v/v) at room temperature; the cells were re-extracted with  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1, v/v) and  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1, v/v) for 16 h. The three organic phases were pooled and concentrated by means of rotary evaporation. The crude lipid extracts were partitioned between the aqueous and the organic phases arising from a mixture of  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v). The lower organic phases were collected and evaporated to dryness to yield the crude lipid extracts from each strain. Subsequently, they were examined comparatively using TLC on silica gel-coated plates (Durasil-25, 0.25 mm thickness, Macherey–Nagel) developed with  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (30:8:1 or 65:25:4, by vol.). Glycolipids were detected by spraying plates with 0.2% anthrone in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by heating. The corynomycolate content of extractable lipids was determined in three independent experiments as follows. Lipid extracts (100 mg) of the various strains were dried under vacuum and saponified (Daffé *et al.*, 1983); the saponified products were acidified with 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The resulting fatty acids were extracted with diethyl ether, washed with water, converted to methyl esters with diazomethane and dried under vacuum, and weighed. The fatty acid methyl esters were separated from contamination on a silica gel column irrigated with different concentrations of diethyl ether in petroleum ether (0, 5, 10, 20 and 100%, v/v). Fractions were analysed by TLC developed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Lipids were detected by spraying plates with rhodamine B and fractions containing corynomycolates were pooled and weighed. The AG-bound mycolic acids present in the delipidated cells, i.e. the material after the  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  extraction (described above), were saponified with 40% KOH in 2-methoxyethanol (1:7, v/v) at 110 °C for 3 h (Daffé *et al.*, 1983) and the solution was neutralized using 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The released mycolic acids were extracted with diethyl ether and methylated with diazomethane. The resulting fatty acid methyl esters were examined using TLC on silica gel-coated plates developed as described above. When significant amounts of fatty acids other than mycolic acids were present in the saponification products, corynomycolates were isolated by chromatography on a silica gel column as described above and weighed.

**Epimerase assay.** The cell wall or cell membrane (70 µl, 5.5 mg protein ml<sup>-1</sup>), 10 mM ATP (1 µl), 10 mM each of FAD, NAD and NADP (3 µl each), and [<sup>14</sup>C]pRpp (20 µl, 10 000 c.p.m. µl<sup>-1</sup>) were added to MOPS buffer (pH 8 with MgCl<sub>2</sub>) to give a final volume of 160 µl. The reaction mixture was incubated for 90 min at 37 °C. Subsequently, the mixture was extracted with  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (8:4:3, by vol.), centrifuged briefly at 4500 g, and the organic layer was separated and dried. This was subjected to TFA (2 M) hydrolysis for 1 h at 110 °C, cooled, dried down in CH<sub>3</sub>OH and analysed for Ara and ribose content by HPLC. The samples (neutral sugars after TFA hydrolysis) were analysed using a CarboPac PA01 analytical column (4 × 250 mm). The sugars were separated with an isocratic solvent system consisting of 10% NaOH (100 mM) in water for 45 min. The

$^{14}\text{C}$ -containing components were detected using a Beta ram detector. The same HPLC system was connected to a PAD to detect non-radioactive standards of the respective sugars for comparative quantification.

## RESULTS

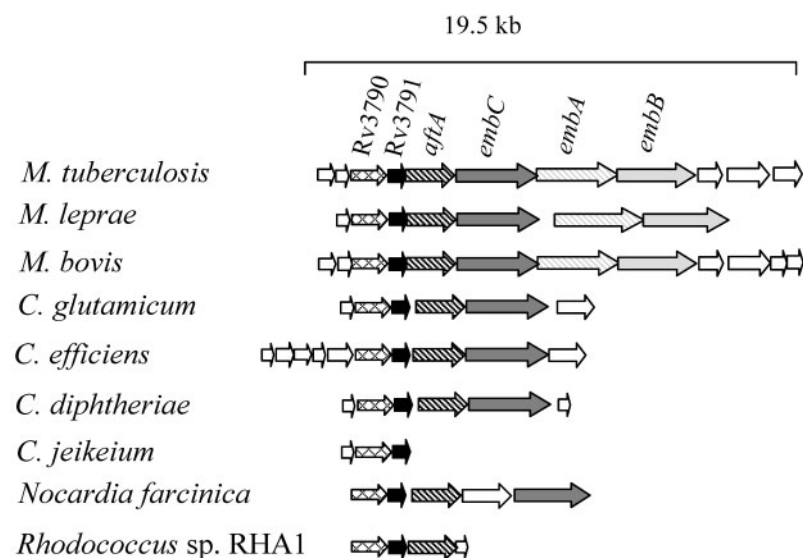
### Genomic comparison of the 3790–3791 locus

Data from Mikusova *et al.* (2005) strongly suggest that in *M. tuberculosis* the products of *Rv3790* and *Rv3791* work in concert to catalyse the conversion of DPR to DPA. *Rv3790* and *Rv3791* are located upstream of the genes encoding the arabinosyltransferases *AftA*, *EmbA*, *EmbB* and *EmbC* (Fig. 2). All these genes are part of a large cell wall biosynthesis cluster containing, among others, *Rv3806c*, which encodes the enzyme involved in the first step of DPA synthesis, the transfer of a 5-phosphoribosyl residue from pRpp to decaprenyl phosphate to form DPPR (Huang *et al.*, 2005). An *in silico* analysis revealed that orthologues of *Rv3790* and *Rv3791* are present in all the available genome sequences of *Corynebacterineae*. The two genes are always organized in a putative operon and, except in *Corynebacterium jeikeium*, are adjacent to the *aftA-emb* cluster (Fig. 2). In *C. glutamicum*, *Rv3790* and *3791* orthologues correspond to genes *NCgl0187* and *NCgl0186*, respectively. Sequence comparisons at protein level show 65 % identity for *Rv3790* and *NCgl0187* and 57 % identity for *Rv3791* and *NCgl0186*. As *Rv3790* and *Rv3791* are presumably essential in *M. tuberculosis* (Sasseti *et al.*, 2003), attempts were made to delete their *C. glutamicum* orthologues in order to address the question of the functions of the corresponding enzymes in the biosynthesis of AG *in vivo*, a strategy already successfully used to decipher the functions of mycobacterial essential genes (Alderwick *et al.*, 2006a, b; Portevin *et al.*, 2004, 2005).

### Construction and growth characteristics of Cg-Δ186

In an attempt to delete either *NCgl0186* or *NCgl0187*, non-replicative pK18mobsac-derivative plasmids were constructed (pK18mobsacΔ186 and pK18mobsacΔ187), each carrying sequences adjacent to the gene to be deleted (Schafer *et al.*, 1994).  $\text{Km}^{\text{S}}$  and  $\text{Suc}^{\text{R}}$  clones resulting from two recombination events between plasmid and chromosome were obtained for both deletions. In the case of *NCgl0186*, 50 clones were analysed by PCR and half of them were found to have a gene deletion at the expected position. In comparison to the wild-type strain, however, the  $\Delta\text{NCgl0186}$  mutant (thereafter named Cg-Δ186) exhibited no significant phenotypic changes, had similar growth and did not aggregate in liquid cultures. These results indicated that although *NCgl0186* may be involved in the synthesis of DPA, the mutant strain has a behaviour very different from that previously observed for the mycolate-less or AG-truncated mutants, i.e. a rough and matt colony phenotype, instead of the smooth and shiny one of the wild-type, and very slow growth and strong aggregation in liquid cultures (Alderwick *et al.*, 2006a, b; Portevin *et al.*, 2004, 2005).

In the case of *NCgl0187* about 200 clones were analysed by PCR but, unlike *NCgl0186*, all of the clones showed the wild-type genotype, indicating either a strong disadvantage of *NCgl0187* deletion or the essentiality of the gene even in the corynebacterial host. Furthermore, even when the analysis was continued up to 3 weeks to eventually obtain slow-growing rough-textured colonies as described for *emb* and *aftA* mutants in *C. glutamicum* (Alderwick *et al.*, 2005, 2006b), no such colonies were visible. As no deletion mutant could be obtained for *NCgl0187*, we attempted to inactivate the gene by plasmid integration, but no integration mutants could be obtained by this procedure



**Fig. 2.** Comparison of the *Rv3790/3791* locus within *Corynebacterineae*. In *M. tuberculosis* the locus contains *Rv3790*, *Rv3791*, *aftA*, *embC*, *embA* and *embB*, and five other ORFs, three of unknown function and the last two annotated *fadD35* and *transposase*. Together these ORFs cover the genome sequence (RefSeq no. NC\_000962) between positions 4 234 780 and 4 254 327. In *C. glutamicum* the locus contains *NCgl0186* (*Rv3790* orthologue), *NCgl0187* (*Rv3791* orthologue), *aftA*, *Cg-emb* (*embC* orthologue) and two ORFs of unknown functions. These ORFs cover the genome sequence (RefSeq no. NC\_003450) between positions 201 757 and 211 759.

either. We thus concluded that *NCgl0187* is likely an essential gene.

### Glycosyl compositional analysis of the cell wall and AG from Cg-Δ186 and ATCC 13032 strains

Purified cell walls from Cg-Δ186 and its parental ATCC 13032 wild-type of *C. glutamicum* were analysed for glycosyl composition. As shown in Table 1, Cg-Δ186 still produced Ara but contained only half of the amount observed in the wild-type strain, resulting in a lower Ara:Gal ratio than that of the ATCC 13032 strain. A similar diminution of the Rha:Gal ratio was also observed for the mutant strain, suggesting that the rhamnosyl residues are linked to the arabinan moiety of AG. Confirmation of these data came from the analysis of AG released from the peptidoglycan using base treatment, as described previously for mycobacterial cell walls (Daffé *et al.*, 1990), which showed a twofold decrease in the Ara:Gal and Rha:Gal ratios of the mutant when compared with those of the parental strain (data not shown). Complementation of Cg-Δ186 with plasmid pCGL2330 (containing *NCgl0186*) or pCGL2331 (containing *Rv3191*) led in both cases to the restoration of a normal level of Ara (Table 1). This indicated that the mycobacterial *Rv3191* protein exhibited *in vivo* a function similar to that of the corynebacterial *NCgl0186*. The Rha:Gal ratio was, however, only slightly increased (10%) by complementation of Cg-Δ186 with the plasmid containing *NCgl0186* and unchanged by the presence of a plasmid containing *Rv3791*, a phenomenon likely to be due to a problem with co-regulation of the synthesis of the Rha-containing arabinan segment of AG. We thus concluded that *NCgl0186* is directly or indirectly involved in the reaction of epimerization of DPR into DPA, but that another enzyme possessing a similar function is likely to be present in *C. glutamicum*. These data are consistent with the normal growth phenotype observed for the Cg-Δ186 strain.

**Table 1.** Quantitative analysis of the sugar constituents of the cell walls extracted from *C. glutamicum* ATCC 13032, its isogenic Δ*NCgl0186* (Cg-Δ186) mutant and the mutant complemented with either the corynebacterial gene [Cg-Δ186(pCGL2330)] or its mycobacterial orthologue [Cg-Δ186(pCGL2331)]

Purified cell walls were hydrolysed with acid and the resulting materials were derivatized and analysed by GC, as described in Methods. The values are the means ± SD of at least three independent experiments.

Strain	Ara:Gal	Rha:Gal
Wild-type	4.50 ± 0.5	1.0 ± 0.1
Cg-Δ186	2.20 ± 0.2	0.56 ± 0.05
Cg-Δ186(pCGL2330)	4.60 ± 0.5	0.60 ± 0.05
Cg-Δ186(pCGL2331)	4.30 ± 0.3	0.60 ± 0.05

### In vitro epimerization of DPR into DPA by cell membrane and cell wall from Cg-Δ186 and wild-type strains

To prove the direct involvement of *NCgl0186* in DPA biosynthesis in *C. glutamicum* we determined the effect of mutation of the coding gene on the epimerization of DPR into DPA. Thus, both membranes and cell walls prepared from Cg-Δ186 and its parental strain, ATCC 13032, were independently incubated with radioactive p[<sup>14</sup>C]Rpp and decaprenyl phosphate. The resulting mixtures of DP[<sup>14</sup>C]R and DP[<sup>14</sup>C]A were hydrolysed and the radioactive sugars released were analysed by HPLC. The epimerization of DPR into DPA was observed when wild-type cell membranes and, to a lesser extent, wild-type cell walls were used as enzyme sources (Table 2). When the experiments were done with Cg-Δ186 cell walls and cell membranes we observed a 50% decrease in the DPA formed as compared with the wild-type. This change was partially restored by complementation with *NCgl0186*. Overexpression of *NCgl0186* in the wild-type bacterium did not lead to increased epimerization (Table 2), probably due to the fact that *NCgl0186* was not limiting for epimerization in the wild-type bacterium. These data established the direct involvement of *NCgl0186* in the epimerization of DPR into DPA and confirmed the contribution of another enzyme with similar function.

### Structural analysis of the AG from the cell walls of Cg-Δ186 and wild-type strains

In order to investigate the potential effects of *NCgl0186* deletion on the structure of AG we performed different types of analysis. First, the soluble AG from Cg-Δ186 and wild-type were treated with an arabinase partially purified from *Mycobacterium smegmatis* (Dong *et al.*, 2006), and the reaction products were analysed by MALDI-TOF MS. Similar fragments were observed in the degradative products of the AG from the wild-type and Cg-Δ186 strains; they were composed of oligomers of Ara of up to nine residues. Second, the soluble AGs from both strains were treated with a mixture of arabinases and galactofuranases from *Cellulomonas* (McNeil *et al.*, 1994), and analysed by HPLC and MALDI-TOF MS. Again, no significant difference could be detected between the patterns obtained from Cg-Δ186 and ATCC 13032 strains by this method (data not shown). Consistent with these observations, the glycosyl-linkage compositions of the AG from the wild-type and mutant strains of *C. glutamicum* were very similar to one another and to those of other strains of the species (Alderwick *et al.*, 2005; Gebhardt *et al.*, 2007). Finally, since <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of AGs has proven to be an appropriate tool for comparative qualitative analysis of AGs, AG from the two isogenic strains was compared by this technique (Daffé *et al.*, 1990, 1993; Gebhardt *et al.*, 2007). The <sup>13</sup>C-NMR spectra obtained from Cg-Δ186 and ATCC 13032 were superimposable (data not shown) and identical to that published

previously for another strain of *C. glutamicum* (Gebhardt *et al.*, 2007). We thus concluded that the AGs from the two strains were composed of the same structural motifs.

### Lipid analysis of the Cg-Δ186 and wild-type strains

In view of the decrease in the Ara content of the AG from Cg-Δ186, we reasoned that this might affect the lipid profile of the mutant, notably the amount of corynomycolates linked to AG. Accordingly, we performed a comparative lipid analysis of Cg-Δ186 and the wild-type strain, focusing on corynomycolate-containing compounds, i.e. cell wall and trehalose monocorynomycolate (TMC) and trehalose dicorynomycolate (TDCM) (Puech *et al.*, 2001). Cells were labelled with acetate and the lipids were extracted with organic solvents. Analysis of the extractable lipids by TLC and quantification of the corynomycolate esterifying trehalose showed that the mutant strain accumulated 57% more corynomycolates than did the parent strain (Table 3). Concomitantly, the Cg-Δ186 strain contained 40% less corynomycolates covalently bound to AG (Table 3). These data showed that *NCgl0186* deletion affected the tethering of corynomycolates to AG, probably through the reduction of the number of sites of attachment of these lipids. Consistent with this finding, this phenotype was completely reversed in the mutant strain complemented with either pCGL2330 (containing *NCgl0186*) or pCGL2331 (containing *Rv3191*). We thus concluded that Cg-Δ186 elaborated an AG with fewer Ara units and corynomycoloyl residues but with structural motifs qualitatively similar to those of the parental strain.

**Table 2.** Epimerization of DPR to DPA by cell membranes and cell walls of *C. glutamicum* ATCC 13032, its isogenic Δ*NCgl0186* (Cg-Δ186) mutant and the complemented mutant Cg-Δ186(pCGL2330), and the wild-type strain in which *NCgl0186* was overexpressed [ATCC 13032(pCGL2330)]

Epimerase activity was assayed by measuring the ability of cell wall or cell membrane extracts to transform pRpp into DPA. The percentages of Ara and ribose were determined relative to the sum of the two sugars present in the isolated mixture. The values are the means ± SD of at least three independent experiments.

Strain	Cell wall as enzyme source		Cell membrane as enzyme source	
	Ara (%)	Ribose (%)	Ara (%)	Ribose (%)
ATCC 13032	72 ± 4	28 ± 4	83 ± 2	17 ± 3
Cg-Δ186	41 ± 3	59 ± 3	51 ± 3	49 ± 3
Cg-Δ186(pCGL2330)	44 ± 3	56 ± 3	63 ± 4	37 ± 4
ATCC 13032(pCGL2330)	62 ± 2	38 ± 2	78 ± 3	22 ± 3

**Table 3.** Quantitative analysis of cell wall-linked and extractable corynomycolates from *C. glutamicum* ATCC 13032, its isogenic mutant Δ*NCgl0186* (Cg-Δ186) and the mutant complemented with either the corynebacterial gene [Cg-Δ186(pCGL2330)] or its mycobacterial orthologue [Cg-Δ186(pCGL2331)]

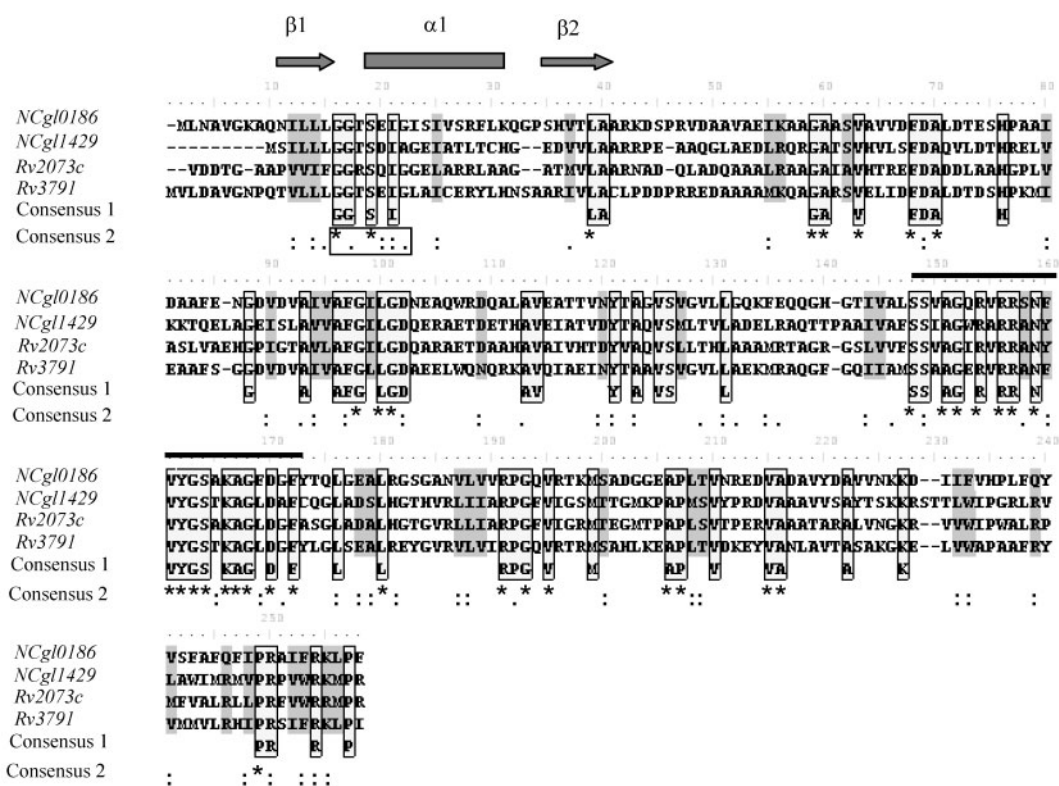
The percentages of corynomycolates in cell walls and extractable lipids were determined relative to the masses of the delipidated cells and extractable lipids, respectively. The values are the means ± SD of at least three independent experiments. Corynomycolates were isolated by saponification of the delipidated cells and extractable lipids, purified by chromatography and weighed, as described in Methods.

Strain	Wall-linked corynomycolates (%)	Corynomycolates in extractable lipids (%)
ATCC 13032	1.0 ± 0.1	33 ± 2
Cg-Δ186	0.6 ± 0.1	52 ± 3
Cg-Δ186(pCGL2330)	1.1 ± 0.1	29 ± 2
Cg-Δ186(pCGL2331)	1.0 ± 0.1	28 ± 2

### Search for an NCgl0186 orthologue and construction of the corresponding mutant

As DPA has been shown to be the only donor of Ara in *C. glutamicum* (Alderwick *et al.*, 2005), these results indicated that DPA is still produced by the Cg-Δ186 mutant, as confirmed by enzyme assay (Table 2). As a consequence, the occurrence of Ara in the mutant could be explained by the redundancy of *NCgl0186* in *C. glutamicum* or, alternatively, *NCgl0186* could have a function in corynebacteria different from that of *Rv3791* in mycobacteria, despite the homology and the similar genomic environment of the two genes, i.e. *Rv3791* and *NCgl0186*. However the last hypothesis seems unlikely in view of our data that show that the expression of *Rv3791* is able to complement the deficit of Cg-Δ186 in Ara. In order to identify genes encoding one or more proteins functionally equivalent to *NCgl0186* in *C. glutamicum*, BLAST searches were performed against this genome using *NCgl0186* as a query sequence (Altschul *et al.*, 1990). On the basis of the score values, only one sequence, the product of the *NCgl1429* gene, could be considered to encode a paralogous protein. This protein shows 35% identity with *NCgl0186* (Fig. 3). We checked for the occurrence of an *NCgl1429* orthologue in the *M. tuberculosis* genome and found *Rv2073c*. As shown in Fig. 3 amino acid alignments of *NCgl1429* and *Rv2073c* with *NCgl0186* and *Rv3791* revealed well-conserved blocks, and led us to propose *NCgl1429* as the protein possessing a functional redundancy with *NCgl0186*. It should be noted that, in contrast to *NCgl0186*, no paralogue was found for *NCgl0187* in *C. glutamicum*. We thus attempted to delete *NCgl1429* both in ATCC 13032 and in Cg-Δ186.

A *km* resistance cassette flanked by arms about 500 bp identical to the 5' and 3' parts of *NCgl1429* was cloned into



**Fig. 3.** Multiple alignments of protein sequences of NCgl0186, Rv3791, NCgl1429, Rv2073c and the deduced consensus sequence (consensus 1). Identical residues are boxed and similar amino acids have light-grey backgrounds. The line above the sequence indicates the conserved block chosen for computational analysis. The first three secondary elements predicted from the NCgl0186 sequence are shown. Consensus 2 corresponds to the consensus sequence obtained from CLUSTAL W alignments of all the orthologues found in *Corynebacterineae* given in Supplementary Table S2, except for MAP1819c of *M. paratuberculosis*, which was not considered for the end of the alignment owing to its length (187 residues). Boxed residues in consensus 2 correspond to a conserved motif that may be involved in cofactor binding.

a vector unable to replicate in corynebacteria. This construct was transferred into both *C. glutamicum* ATCC 13032 and Cg- $\Delta$ 186. In both cases *km<sup>R</sup>* transformants were obtained and analysed by PCR using various combinations of primers. From the wild-type strain one clone (Cg- $\Delta$ 1429) among 20 gave the amplification pattern consistent with allelic replacement of *NCgl1429* with the *km* cassette. This exchange was the result of two recombination events. In the Cg- $\Delta$ 186 host only the first recombination event, corresponding to plasmid integration, could be obtained, as revealed by the analysis of 200 clones. This absence of deletions led us to suspect that, as for *NCgl0187*, inactivation of both genes (i.e. *NCgl0186* and *NCgl1429*) was not possible because of the essentiality of the function associated with the two proteins in the epimerization of DPR to DPA. To conclusively demonstrate this hypothesis we tried to inactivate *NCgl1429* in Cg- $\Delta$ 186 by plasmid integration in the presence or absence of a functional copy of *NCgl0186*. For that purpose a pCR2.1-TOPO plasmid derivative containing an ~500 bp *NCgl1429* internal fragment was first constructed (TOPO::1429). We then transferred a copy of *NCgl0186* under the control of the

*ospB* promoter into this plasmid (TOPO::1429-cspB186). No integration mutants could be obtained when Cg- $\Delta$ 186 was transformed with TOPO::1429, while integration took place very easily when TOPO::1429-cspB186 was used as integration vector. These data demonstrated that *NCgl1429* is essential in the absence of *NCgl0186*.

### Analysis of the NCgl1429 mutant strain

Cell walls from Cg- $\Delta$ 1429 were analysed for glycosyl composition and corynomycolate content as described for Cg- $\Delta$ 186 and ATCC 13032. Surprisingly, and in sharp contrast with Cg- $\Delta$ 186, no change in the Ara:Gal and Rha:Gal ratios could be detected in the mutant strain, compared with the wild-type. Likewise, no significant difference was observed in terms of amounts of extractable and bound corynomycolates of the mutant, compared with the parental ATCC 13032 strain. These results strongly suggest that in the presence of a functional NCgl0186, NCgl1429 has no detectable contribution *in vivo*. Based on the data obtained previously with the partially redundant mycolyltransferases of *M. tuberculosis* (Puech *et al.*, 2002),



we tested the *in vivo* effect of *NCgl1429* overexpression on the epimerization reaction in the absence of *NCgl0186*. For that purpose, a plasmid containing the *NCgl1429* ORF under the control of the strong promoter of *cspB* was constructed (pCGL2333) and introduced into the Cg- $\Delta$ 186 strain. As we have shown that the quantification of corynomycolates linked to AG reasonably reflects the complementation of the phenotype of the Cg- $\Delta$ 186 mutant (Table 3), we performed a quantitative analysis of the cell wall corynomycolates of Cg- $\Delta$ 186(pCGL2333). The percentage of cell wall-linked corynomycolates of Cg- $\Delta$ 186(pCGL2333) was found to be 1% ( $\pm 0.1$ ), a value close to that obtained with the wild-type strain and with the Cg- $\Delta$ 186 strain complemented with either *NCgl0186* or *Rv3791* (Table 3). This result indicated that overexpression of *NCgl1429* *in vivo* could restore the defect in AG produced by the absence of *NCgl0186*, thus pointing to a partial redundancy of the two enzymes similar to that demonstrated for the three mycoloyltransferases of *M. tuberculosis* (Puech *et al.*, 2002).

### Conservation and redundancy of *NCgl0186* orthologous proteins among *Corynebacterineae*

*NCgl0186*, *NCgl1429*, *Rv3791* and *Rv2073c* belong to the superfamily of short chain dehydrogenases/reductases (SDRs), which contains enzymes catalysing NAD(P)(H)-dependent oxido-reduction (Jornvall *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 2003). This is a large and functionally heterogeneous protein family with low sequence identities but with conserved motifs and common structural organization. In bacteria the number of SDR members deduced from genome analysis varies considerably from one organism to another, but it should be noted that this number is especially large in *M. tuberculosis* (57 members) (Jornvall *et al.*, 1999). We wanted to evaluate the level of sequence conservation and of redundancy of *NCgl0186* orthologues among the *Corynebacterineae*. For this purpose, one of the conserved blocks, SSxAGxRrRRxNx-VYGSxKAGD (shown in Fig. 3), was chosen. It contains the three conserved residues of the catalytic active triad (S, Y and K) characteristic of SDR proteins (Oppermann *et al.*, 2003). This motif was searched for in the NCBI Reference Sequence (RefSeq) collection (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Forty-seven sequences were found to match

with this motif totally and six more with one mismatch. Pair-wise alignments showed that 52 of the 53 sequences possessed between 36 and 100% identities with *Rv3791* and thus can be considered to be closely related. All these protein sequences belong to *Actinomycetales*, mostly to *Corynebacterineae* (see Supplementary Table S2). This analysis shows that all members of *Corynebacterineae* for which the genome sequence is known possess at least one, and the great majority two, orthologous genes.

The SDR superfamily is divided into five families on the basis of protein length and specific sequence motifs. According to their length (between 242 and 260 aa, except for MAP1819c from *Mycobacterium paratuberculosis*, which has only 187 residues) the proteins identified in this work are classical SDRs. CLUSTAL W alignment (Fig. 3) and secondary structure predictions performed on these protein sequences allowed the identification of only two SDR motifs specific to the classical family among the seven proposed by Kallberg *et al.* (2002) (Table 4). In particular, the typical pattern of three Gly residues (TGxxxGxG) in the N-terminal domain characteristic of the NAD(P)(H)-binding site is missing. Nevertheless, a conserved motif, GG/AxSxxG/A, localized in the  $\beta$ 1- $\alpha$ 1 predicted structure that resembles the patterns of both intermediate SDRs (G/AxxGxxG/A) and divergent SDRs (GxxxxSxA), could constitute an atypical dinucleotide-binding motif (Fig. 3, Table 4).

## DISCUSSION

The mAGP complex, which constitutes the cell wall skeleton of the very singular cell envelope of *Corynebacterineae*, represents, with mycolic acids, the hallmark of all the members of this group of bacteria (Besra *et al.*, 1995; Daffé, 2005; Dover *et al.*, 2004; McNeil *et al.*, 1991). Despite the physiological importance of this complex, its biosynthesis is far from being totally understood, mostly because of its essentiality for the viability of *M. tuberculosis*. However, thanks to the use of *C. glutamicum* as a model organism for *Corynebacterineae*, significant progress on understanding AG biosynthesis has been made recently, in particular with the discovery of new glycosyltransferases (Alderwick *et al.*, 2006b; Seidel *et al.*, 2007). As AG is made up of D-arabinofuranosyl and

**Table 4.** Conserved motifs in the *NCgl0186* orthologue group and comparison with classical SDR motifs

Secondary structure elements were predicted using PredictProtein (Rost *et al.*, 2004). In the motif, 'a' denotes an aromatic residue, 'h' a hydrophobic residue and 'x' any residue. Alternative amino acids at a motif position are given within brackets.

Secondary structure element	Classical SDR motif*	<i>NCgl0186</i> orthologue group motif	Suggested function*
$\beta$ 1 + $\alpha$ 1	TGxxGhaG	G[GA]xSx[EDQ][IM][GA]	Structural role in cofactor-binding region
$\beta$ 3 + $\alpha$ 3	DAx[DV]	[DEN]Ax[DV]	Binding of coenzyme
$\alpha$ 5	Yx[AS][ST]K	YGS[AT]K	Part of active site

\*Persson *et al.* (2003).

D-galactofuranosyl units, which are both rare sugars (McNeil *et al.*, 1987), a complete understanding of their biosynthetic pathways could provide suitable targets for new chemotherapeutics. Ara is produced from DPA, the formation of which in mycobacteria has been shown to proceed by an unusual epimerization reaction that occurs when the sugar is linked to a prenyl phosphate (Mikusova *et al.*, 2005). Previous experiments performed with purified recombinant Rv3790 and Rv3791 proteins from *M. tuberculosis* have shown that DPR could be converted into DPA in an *in vitro* system when both proteins were present in the reaction mixtures (Mikusova *et al.*, 2005). Despite the fact that Rv3790 and Rv3791 were sufficient to catalyse the epimerization of DPR *in vitro*, there is no indication that, in a physiological context, other proteins are not also involved in this reaction. To investigate the *in vivo* functions of these proteins in the biosynthesis of AG, we deliberately chose to inactivate their orthologues *NCgl0186* and *NCgl0187* in *C. glutamicum*. This strategy was based on the fact that, unlike mycobacteria, corynebacteria can survive with a truncated AG totally devoid of the arabinan domain (Alderwick *et al.*, 2005), and because of the synteny observed for the 3790/3791 locus from genome analysis of numerous *Corynebacterineae*, suggesting conserved functions for the orthologous proteins.

While the deletion of *NCgl0186* was very easy to achieve, all our attempts to delete *NCgl0187* were unsuccessful, probably reflecting the essentiality of this gene. The earlier generation of a *ubiA* mutant in *C. glutamicum* and its analysis has shown that DPA is the only Ara donor for AG biosynthesis and, as a consequence, its total absence leads to the production of a galactan instead of an AG (Alderwick *et al.*, 2005, 2006a). Cg- $\Delta$ 186 showed a different pattern: the strain possesses an AG with the same structural motifs as the wild-type strain but contains a significantly reduced quantity of arabinosyl residues. The fact that arabinan was reduced but not totally absent demonstrated a role for *NCgl0186* in DPA synthesis, but either in a way different from that observed for Rv3791 *in vitro* or with functional redundancy in *C. glutamicum*. The first hypothesis is unlikely for two reasons. First, a direct involvement of *NCgl0186* in DPR epimerization was verified by *in vitro* experiments. Second, a normal level of Ara was restored by *in vivo* Rv3791 expression in Cg- $\Delta$ 186. An *in silico* search for paralogues of *NCgl0186* revealed only one gene, *NCgl1429*, which is conserved among all *Corynebacterineae* except *M. leprae* and *Mycobacterium bovis* species. Although the genetic organization around *NCgl1429* or its orthologues differs from one species to another, the gene of interest is always in close proximity, and likely in some cases in an operon together with genes encoding proteins predicted to be involved in precorrin biosynthesis. As in the case of *NCgl0186*, deletion of *NCgl1429* was very easy to realize in the wild-type strain but, in contrast to Cg- $\Delta$ 186, the resulting mutant synthesized an AG with an Ara:Gal ratio identical to that of the wild-type strain. However, the

hypothesis that *NCgl1429* is involved in DPA synthesis is strongly supported by the following observations. (i) *NCgl1429* could be inactivated in the presence of a copy of *NCgl0186* but not in its absence, indicating that *NCgl1429* becomes essential when *NCgl0186* is absent. (ii) A total recovery of cell wall mycolates was obtained when *NCgl1429* was overexpressed in the absence of *NCgl0186*, indicating that *NCgl1429* could fully replace *NCgl0186* in the epimerization reaction under these conditions. We thus propose that epimerization of DPR into DPA involves three enzymes that catalyse two distinct steps, each being essential for the viability of the cell. One step would be catalysed by *NCgl0187* and another by *NCgl0186*; in the absence of the latter enzyme, the reaction would be catalysed by *NCgl1429*. Although it has been shown previously that epimerization results from DPR oxidation followed by reduction to DPA (Mikusova *et al.*, 2005), we were not able to dissect the two steps by identifying which enzyme is responsible of the oxidation reaction and which catalyses the reduction reaction.

By deleting *NCgl0186* we obtained, for what is believed to be the first time, a mutant in which the DPA synthesis is lowered, allowing us to determine the influence of DPA level on AG biosynthesis *in vivo*. Considering the significant diminution of Rha and corynomycolates observed for the Cg- $\Delta$ 186 mutant and the occurrence of similar structural motifs in the mutant and the wild-type in our structural analyses of AG, it seems that a decrease in DPA synthesis leads to a decrease in the number of branching arabinan chains rather than in the length of these chains. These results suggest that changes in the level of DPA could influence the number of priming sites for AraF deposition to the galactan core but not (or to a lesser extent) Ara polymerization.

The essentiality of the epimerization step was unexpected as the inactivation of the gene encoding the first enzyme involved in DPA synthesis, the DPPR synthase (*UbiA*), in *C. glutamicum*, produced a viable mutant (Alderwick *et al.*, 2005). One possible reason is that absence of epimerization leads to a continued synthesis of DPR, which in turn significantly affects the pool of decaprenyl phosphate, so that this becomes limiting for peptidoglycan synthesis and lethal for the cell. This hypothesis has to be proven experimentally.

Apparent redundancy of gene function appears to be common among genes involved in a wide range of physiological processes. This redundancy has been found for some enzymes involved in cell wall biosynthesis in *Corynebacterineae*, such as mycoloyltransferases in corynebacteria (Brand *et al.*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003) and mycobacteria (Puech *et al.*, 2002), and Embs in mycobacteria (Escuyer *et al.*, 2001). It could also be the case for the enzyme that dephosphorylates DPPR to DPR. This phosphatase is believed to be encoded by the gene located directly upstream of *ubiA* (*Rv3807c* in *M. tuberculosis* and *NCgl2782* in *C. glutamicum*). Preliminary

experiments with an *NCgl2782* mutant of *C. glutamicum* indicate that if this gene is effectively the phosphatase, a redundant enzyme must exist, as in the case of *NCgl0186*. In agreement with this, *in silico* analysis showed a paralogue (*NCgl2785*) located very close to *NCgl2782*. Further experiments will be needed to determine the precise role of the enzymic redundancies observed in the synthesis of DPA and more generally in cell wall compound biosynthesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Anne Lemassu for her valuable assistance in NMR spectroscopy. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and by National Institutes of Health (NIH, USA), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), grant AI37706 to M.M. The NMR spectrometers were financed by the CNRS, the University Paul Sabatier, the Région Midi-Pyrénées, and the European Structural Funds (FEDER).

## REFERENCES

- Alderwick, L. J., Radmacher, E., Seidel, M., Gande, R., Hitchen, P. G., Dell, A., Sahm, H., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2005). Deletion of *Cg-emb* in Corynebacterineae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of *Cg-ubiA* results in an arabinan deficient mutant with a cell wall galactan core. *J Biol Chem* **280**, 32362–32371.
- Alderwick, L. J., Dover, L. G., Seidel, M., Gande, R., Sahm, H., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2006a). Arabinan deficient mutants of *Corynebacterium glutamicum* and the consequent flux in decaprenylmonophosphoryl-D-arabinose metabolism. *Glycobiology* **16**, 1073–1081.
- Alderwick, L. J., Seidel, M., Sahm, H., Besra, G. S. & Eggeling, L. (2006b). Identification of a novel arabinofuranosyl transferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**, 15653–15661.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley.
- Besra, G. S., Khoo, K. H., McNeil, M. R., Dell, A., Morris, H. R. & Brennan, P. J. (1995). A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 4257–4266.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F. & Leblon, G. (1990). Interspecies electro-transformation in Corynebacteria. *FEMS Microbiol Lett* **54**, 263–269.
- Brand, S., Niehaus, K., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2003). Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol* **180**, 33–44.
- Daffé, M. (2005). The cell envelope of corynebacteria. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, pp. 121–148. Edited by L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Daffé, M. & Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**, 131–203.
- Daffé, M., Lanéelle, M. A., Asselineau, C., Levy-Febrault, V. & David, H. (1983). Intérêt taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann Microbiol (Paris)* **134**, 241–256 (in French).
- Daffé, M., Brennan, P. J. & McNeil, M. (1990). Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analyses. *J Biol Chem* **265**, 6734–6743.
- Daffé, M., McNeil, M. & Brennan, P. J. (1993). Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr Res* **249**, 383–398.
- De Sousa-D'Auria, C., Kacem, R., Puech, V., Tropis, M., Leblon, G., Houssin, C. & Daffé, M. (2003). New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycolyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 35–44.
- Dong, X., Bhamidi, S., Scherman, M., Xin, Y. & McNeil, M. R. (2006). Development of a quantitative assay for mycobacterial endogenous arabinase and ensuing studies of arabinase levels and arabinan metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2601–2605.
- Dover, L. G., Cerdano-Tarraga, A. M., Pallen, M. J., Parkhill, J. & Besra, G. S. (2004). Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 225–250.
- Dusch, N., Puhler, A. & Kalinowski, J. (1999). Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1530–1539.
- Escuyer, V. E., Lety, M. A., Torrelles, J. B., Khoo, K. H., Tang, J. B., Rithner, C. D., Frehel, C., McNeil, M. R., Brennan, P. J. & Chatterjee, D. (2001). The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. *J Biol Chem* **276**, 48854–48862.
- Gebhardt, H., Meniche, X., Tropis, M., Kramer, R., Daffé, M. & Morbach, S. (2007). The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae*. *Microbiology* **153**, 1424–1434.
- Huang, H., Scherman, M. S., D'Haese, W., Vereecke, D., Holsters, M., Crick, D. C. & McNeil, M. R. (2005). Identification and active expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose-1-diphosphate: decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase, the first enzyme committed to decaprenylphosphoryl-D-arabinose synthesis. *J Biol Chem* **280**, 24539–24543.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. & Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003–6013.
- Jornvall, H., Hoog, J. O. & Persson, B. (1999). SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett* **445**, 261–264.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H. & Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem* **269**, 4409–4417.
- McNeil, M., Wallner, S. J., Hunter, S. W. & Brennan, P. J. (1987). Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. *Carbohydr Res* **166**, 299–308.

- McNeil, M., Daffé, M. & Brennan, P. J. (1990). Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* **265**, 18200–18206.
- McNeil, M., Daffé, M. & Brennan, P. J. (1991). Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem* **266**, 13217–13223.
- McNeil, M. R., Robuck, K. G., Harter, M. & Brennan, P. J. (1994). Enzymatic evidence for the presence of a critical terminal hexa-arabinoside in the cell walls of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **4**, 165–173.
- Mikusova, K., Huang, H., Yagi, T., Holsters, M., Vereecke, D., D'Haese, W., Scherman, M. S., Brennan, P. J., McNeil, M. R. & Crick, D. C. (2005). Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. *J Bacteriol* **187**, 8020–8025.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y. & other authors (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143–144**, 247–253.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U. & Jornvall, H. (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* **143–144**, 271–278.
- Peyret, J. L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Schechter, E. & Leblon, G. (1993). Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **9**, 97–109.
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M. & Guilhot, C. (2004). A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 314–319.
- Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Montrozier, H., Houssin, C., Stella, A., Lanéelle, M. A., Bardou, F., Guilhot, C. & Daffé, M. (2005). The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J Biol Chem* **280**, 8862–8874.
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Lanéelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R. & Daffé, M. (2001). Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**, 1365–1382.
- Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L. Y., Gicquel, B. & Daffé, M. (2002). Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **44**, 1109–1122.
- Rost, B., Yachdav, G. & Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**, (Web Server issue) W321–W326.
- Sasseti, C. M., Boyd, D. H. & Rubin, E. J. (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**, 77–84.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Scherman, M. S., Kalbe-Bournonville, L., Bush, D., Xin, Y., Deng, L. & McNeil, M. (1996). Polyprenylphosphate-pentoses in mycobacteria are synthesized from 5-phosphoribose pyrophosphate. *J Biol Chem* **271**, 29652–29658.
- Seidel, M., Alderwick, L. J., Birch, H. L., Sahm, H., Eggeling, L. & Besra, G. S. (2007). Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in *Corynebacterineae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**, 14729–14740.
- Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M. & Wells, W. W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Chem Soc* **85**, 2497–2507.
- Tropis, M., Meniche, X., Wolf, A., Gebhardt, H., Strelkov, S., Chami, M., Schomburg, D., Krämer, R., Morbach, S., Daffé, M. & other authors (2005). The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *J Biol Chem* **280**, 26573–26585.
- Wolucka, B. A., McNeil, M. R., de Hoffmann, E., Chojnacki, T. & Brennan, P. J. (1994). Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J Biol Chem* **269**, 23328–23335.
- Xin, Y., Lee, R. E., Scherman, M. S., Khoo, K. H., Besra, G. S., Brennan, P. J. & McNeil, M. (1997). Characterization of the in vitro synthesized arabinan of mycobacterial cell walls. *Biochim Biophys Acta* **1335**, 231–234.

---

Edited by: W. Bitter

### **X.3“Identification of a Stress-Induced Factor of *Corynebacterineae* That Is Involved in the Regulation of the Outer Membrane Lipid Composition”**

Meniche X, Labarre C, de Sousa-d'Auria C, Huc E, Laval F, Tropis M, Bayan N, Portevin D, Guilhot C, Daffé M, Houssin C.

**J Bacteriol.** 2009 Dec;191(23):7323-32. Epub 2009 Oct 2.

#### **Résumé**

*Corynebacterineae* are gram-positive bacteria that possess a true outer membrane composed of mycolic acids and other lipids. Little is known concerning the modulation of mycolic acid composition and content in response to changes in the bacterial environment, especially temperature variations. To address this question, we investigated the function of the Rv3802c gene, a gene conserved in *Corynebacterineae* and located within a gene cluster involved in mycolic acid biosynthesis. We showed that the Rv3802 ortholog is essential in *Mycobacterium smegmatis*, while its *Corynebacterium glutamicum* ortholog, NCgl2775, is not. We provided evidence that the NCgl2775 gene is transcriptionally induced under heat stress conditions, and while the corresponding protein has no detectable activity under normal growth conditions, the increase in its expression triggers an increase in mycolic acid biosynthesis concomitant with a decrease in phospholipid content. We demonstrated that these lipid modifications are part of a larger outer membrane remodeling that occurs in response to exposure to a moderately elevated temperature (42 degrees C). In addition to showing an increase in the ratio of saturated corynomycolates to unsaturated corynomycolates, our results strongly suggested that the balance between mycolic acids and phospholipids is modified inside the outer membrane following a heat challenge. Furthermore, we showed that these lipid modifications help the bacteria to protect against heat damage. The NCgl2775 protein and its orthologs thus appear to be a protein family that plays a role in the regulation of the outer membrane lipid composition of *Corynebacterineae* under stress conditions. We therefore propose to name this protein family the envelope lipids regulation factor (ElrF) family.



## Identification of a Stress-Induced Factor of *Corynebacterineae* That Is Involved in the Regulation of the Outer Membrane Lipid Composition<sup>∇</sup>

Xavier Meniche,<sup>1,2,4,†</sup> Cécile Labarre,<sup>3,†</sup> Célia de Sousa-d'Auria,<sup>3</sup> Emilie Huc,<sup>1,2</sup> Françoise Laval,<sup>1,2</sup> Marielle Tropis,<sup>1,2</sup> Nicolas Bayan,<sup>4</sup> Damien Portevin,<sup>1,2</sup> Christophe Guilhot,<sup>1,2</sup> Mamadou Daffé,<sup>1,2,\*</sup> and Christine Houssin<sup>3,\*</sup>

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 04, France<sup>1</sup>; Université de Toulouse (Toulouse III), 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France<sup>2</sup>; Université Paris Sud-11, CNRS UMR 8621, Institut de Génétique et Microbiologie, Bâtiment 360, F-91405 Orsay, France<sup>3</sup>; and Université Paris Sud-11, CNRS UMR8619, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, F-91405 Orsay, France<sup>4</sup>

Received 7 August 2009/Accepted 23 September 2009

*Corynebacterineae* are gram-positive bacteria that possess a true outer membrane composed of mycolic acids and other lipids. Little is known concerning the modulation of mycolic acid composition and content in response to changes in the bacterial environment, especially temperature variations. To address this question, we investigated the function of the Rv3802c gene, a gene conserved in *Corynebacterineae* and located within a gene cluster involved in mycolic acid biosynthesis. We showed that the Rv3802 ortholog is essential in *Mycobacterium smegmatis*, while its *Corynebacterium glutamicum* ortholog, NCgl2775, is not. We provided evidence that the NCgl2775 gene is transcriptionally induced under heat stress conditions, and while the corresponding protein has no detectable activity under normal growth conditions, the increase in its expression triggers an increase in mycolic acid biosynthesis concomitant with a decrease in phospholipid content. We demonstrated that these lipid modifications are part of a larger outer membrane remodeling that occurs in response to exposure to a moderately elevated temperature (42°C). In addition to showing an increase in the ratio of saturated corynomycolates to unsaturated corynomycolates, our results strongly suggested that the balance between mycolic acids and phospholipids is modified inside the outer membrane following a heat challenge. Furthermore, we showed that these lipid modifications help the bacteria to protect against heat damage. The NCgl2775 protein and its orthologs thus appear to be a protein family that plays a role in the regulation of the outer membrane lipid composition of *Corynebacterineae* under stress conditions. We therefore propose to name this protein family the envelope lipids regulation factor (ElrF) family.

Mycolic acids (MA), high-molecular-weight 2-alkyl and 3-hydroxy fatty acids (FA), are the major lipid constituents of the singular cell envelope of *Corynebacterineae* (9, 29). They occur either as esters of trehalose or as esters of the terminal penta-arabinofuranosyl units of the cell wall arabinogalactan and form with other lipids an additional bilayer functionally similar to the gram-negative outer membrane (29, 37, 50). In addition to their essential structural function, MA have also been implicated in functions related to the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* (9, 14, 38). The structure and biosynthesis of MA have been the subject of intense efforts of research for many decades (13, 46), but still little is known regarding the modulation of their composition and content at a molecular

level in response to changes in the bacterial environment, especially temperature variations.

In response to temperature shifts, bacteria are able to modify their membrane composition to maintain the appropriate fluidity of membrane lipids (11, 17, 42, 45). The most common mechanism used by microorganisms to modulate their plasmic membrane fluidity is a change in the proportion of long-chain and saturated FA of the glycerophospholipids (GPL) (24–26). Changes in the FA composition of lipid A, the lipid moiety of the lipopolysaccharide that constitutes the outer leaflet of the outer membrane of gram-negative bacteria, in response to suboptimal temperature exposure have also been reported (7, 39). Similar regulations are expected for *Corynebacterineae*, since these gram-positive bacteria possess a true outer membrane that constitutes a barrier between these bacteria and the external medium. Indeed, changing the growth temperature has been shown to affect the MA compositions of different species of mycobacteria (1, 19, 47). In addition, correlations between MA structures and the melting points of the cell wall strongly suggest that alteration of MA composition by temperature regulates the fluidity of the outer membrane (22, 23). However, almost nothing is known about the proteins involved in the thermal regulation of the *Corynebacterineae* cell wall composition. Changes in the expression level of enzymes in-

\* Corresponding author. Mailing address for Christine Houssin: Université Paris Sud-11, CNRS UMR 8621, Institut de Génétique et Microbiologie, Bâtiment 360, F-91405 Orsay, France. Phone: 33 1 69 15 69 20. Fax: 33 1 69 15 63 34. E-mail: christine.houssin@igmors.u-psud.fr. Mailing address for Mamadou Daffé: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 04, France. Phone: 33 5 61 175 569. Fax: 33 561 175 580. E-mail: mamadou.daffe@ipbs.fr.

† These authors contributed equally to the present work.

∇ Published ahead of print on 2 October 2009.

involved in MA metabolism (KasA and the so-called Ag85 complex) in response to an elevated growth temperature (55°C) in *Mycobacterium thermoresistibile*, concomitant with significant changes in the MA content and composition, have been described previously (19). At a global level, transcriptional analyses performed with mycobacteria or corynebacteria revealed a complex heat shock response that varies with both temperature and time exposure (2, 30, 33, 44). Recent analysis showed that a large number of genes in *Corynebacterium glutamicum* are differentially expressed under moderate (40°C) and severe (50°C) heat shock conditions, and this includes genes involved in cell wall biogenesis and lipid metabolism (3).

Among the important genes involved in MA biosynthesis are the three genes required for the FA condensation step (*pks13*, *accD4*, and *fadD32*) (35, 36) and those encoding mycoloyl-transferases, the enzymes that catalyze the transfer of a mycoloyl residue onto trehalose, trehalose monomycolate, and/or the cell wall arabinogalactan (5, 12). Among these genes and highly conserved in *Corynebacterineae* is the Rv3802c gene (locus tag in *M. tuberculosis*; the ortholog in *C. glutamicum* is the NCgl2775 gene), the product of which has been recently shown to possess lipase and thioesterase activities in vitro (32, 49).

In this report, we showed that the Rv3802 protein is essential for mycobacterial physiology, in contrast to the case for its corynebacterial ortholog, NCgl2775. Accordingly, we demonstrated that the latter protein is dispensable for normal growth at temperature up to 40°C but is involved in the management of thermal stress at higher temperatures. We characterized the effects of the deletion of the NCgl2775 gene on the growth and viability of heat-shocked cells and further investigated the effects of this deletion or overexpression of the protein on the cell wall lipid content and composition. We showed that the NCgl2775 protein is involved in the regulation of the ratio between MA and phospholipids in response to an increase in temperature exposure of the cells.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains and culture conditions.** *C. glutamicum* RES167 (15) was cultured on brain heart infusion (BHI) medium (Difco). *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 was grown on Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 0.05% Tween 80 to prevent aggregation. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was used for the construction of plasmids and grown on Luria Bertani (LB) medium (Difco). Ampicillin, kanamycin (Km), hygromycin (Hyg), chloramphenicol (Cm), and sucrose (Suc) were added when required at final concentrations of 100  $\mu$ g/ml ampicillin, 40  $\mu$ g/ml (for *M. smegmatis*) or 25  $\mu$ g/ml Km (for *C. glutamicum* and *E. coli*), 50  $\mu$ g/ml Hyg, 15  $\mu$ g/ml or 30  $\mu$ g/ml Cm (for *C. glutamicum* or *E. coli*, respectively), and 5% Suc (wt/vol).

**Construction of plasmids and strains.** (i) **Construction of an *M. smegmatis* MSMEG\_6394 conditional mutant.** The *M. smegmatis* conditional mutant was constructed using a strategy previously described (35). Briefly, a DNA fragment, overlapping the Rv3802 gene ortholog from *M. smegmatis*, was amplified by PCR from the *M. smegmatis* total DNA by using primers 3802A (5'-CAGCAGCCG GTACGGTGAAG-3') and 3802B (5'-GGAATCCGACCAGTAATCGA GGTCTG-3'), mapping 1,528 bp upstream of the start codon and 1,534 bp downstream of the stop codon, respectively. PCR was performed using *M. smegmatis* genomic DNA. The 2-kb fragment was purified and digested with EcoRI and inserted between the SmaI and EcoRI restriction sites of pBluescript to give pBS3802. A Hyg resistance cassette was inserted into the SphI restriction site of pBS3802 (located within the MSMEG\_6394 gene) made blunt following treatment with T4 DNA polymerase to yield pBS3802hyg. In this construction, the *hyg* gene is in the same orientation as the MSMEG\_6394 gene. A 3.5-kb EcoRV fragment carrying the disrupted MSMEG\_6394::*hyg* allele was then inserted into the SmaI site of pJQ200 to yield pDP86. Plasmid pDP86 was transferred into *M.*

*smegmatis* by electroporation and transformants were selected on Hyg-containing plates. Transformants in which pDP86 had been integrated by a single crossover between the wild-type and mutated copies of MSMEG\_6394 were characterized by PCR, using primers 3802C (5'-TCGCCACCATCAAGTAGC ACAC-3'), 3802D (5'-GTGGCAGTTGTGCAGCACCA-3'), H1 (5'-AGCACC AGCGTTTCGCCGT-3'), and H2 (5'-TGCACGACTTCGAGGTGTTCCG-3'). One clone giving the pattern corresponding to the insertion of the plasmid by single homologous recombination event was retained for further analysis and named PMM87. To produce the complementation plasmid, the MSMEG\_6394 gene was amplified by PCR from *M. smegmatis* total DNA by using primers 3802E (5'-CGGGATCCGCAAAGAACGCTCGCGTAAGC-3') and 3802F (5'-GGACTAGTGTACGCTCTCTACGTGCGCG-3'). The 1-kb fragment was purified, digested with BamHI and SpeI, and inserted between the BamHI and SpeI restriction sites of pDP26, a derivative of the thermosensitive mycobacterial plasmid pCG63 (16) containing the mycobacterial expression cassette from pMIP12 (21). The resulting plasmid, named pDP87, contained the MSMEG\_6394 gene under the control of the *pBlaf<sup>+</sup>* mycobacterial promoter (21). Plasmid pDP87 was transferred by electroporation into PMM87, and transformants were selected on plates containing Km and Hyg. The second crossover event at the chromosomal MSMEG\_6394 locus was selected by plating a liquid culture of strain PMM87::pDP87 grown at 32°C on plates containing Km, Hyg, and Suc (5%), which were then incubated at 32°C. Colonies were screened by PCR using primers 3802C, 3802D, H1, and H2. One strain (PMM88::pDP87), in which the wild-type chromosomal copy of the MSMEG\_6394 gene was replaced by the mutated MSMEG\_6394::*hyg* allele, was retained for further analysis.

(ii) **Construction of NCgl2775 deletion strain.** Deletion of the NCgl2775 gene was done using a strategy described previously (35). In brief, two DNA fragments overlapping the NCgl2775 gene at its 5' and 3' extremities were amplified by PCR from *C. glutamicum* total DNA by using primers 2775-del1 (5'-GTCAAT GGCCGACTCGAGGAG-3')/2775-del2 (5'-CGCCGATTAAGCCGCGGAC G-3') (592 bp) and 2775-del3 (5'-CTGTGATGCCGCGTGAATG-3')/2775-del4 (5'-GCTCGTTTAGATCTTAAAGCG-3') (737 bp), respectively. These fragments were purified and inserted flanking a Km resistance cassette into plasmid pMCS5 (MoBiTec, Göttingen, Germany). The resulting plasmid was transferred into *C. glutamicum* RES167 by electroporation (6), and transformants were selected on Km-containing plates. Transformants in which allelic replacement had occurred were selected by PCR analysis using combinations of primers localized upstream and downstream of the NCgl2775 gene and in the *aphIII* sequences. After sequencing of the PCR products, one strain ( $\Delta$ 2775) was selected for further studies.

(iii) **Construction of expression vectors.** Expression vectors encoding NCgl2775 (pCGL482-2775) and MSMEG\_6394 (pCGL482-6394) proteins were constructed using pCGL482 (34) as the cloning vector. We chose to clone these open reading frames (ORFs) under the control of the *mytA* promoter (named *P<sub>op</sub>* hereafter). The coding sequence of the NCgl2775 gene and a DNA fragment containing the *mytA* promoter (355 bp upstream of the *mytA* start codon) were amplified by PCR from *C. glutamicum* ATCC 13032 chromosomal DNA by using primer pairs 2775AM (5'-TATTGTTAACTCATGAGGAAAACC-3')/2775AV (5'-GACGAAGGGCTCGAGGTTTAAG-3') and pCsp1Bam (5'-TTATCCAC AGGATCCGAGG-3')/pCsp1Nco (5'-ACAGGGCGTACGTCAAAGG-3'), respectively. The MSMEG\_6394 ORF was amplified using primers 3802-AM (5'-AAAACCTCCATGGCAAAGAACGC-3') and 3802-AV (5'-CCGGTCATG CATCTCTACGAC-3') from *M. smegmatis* total DNA. All the amplicons were digested with the appropriate restriction endonucleases. Plasmids were obtained by simultaneous ligation of a fragment containing the *P<sub>op</sub>* promoter and a fragment containing one ORF and the appropriately digested pCGL482. Transformants were selected on Cm-containing plates.

(iv) **Construction of the *P<sub>op</sub>-lacZ* reporter strain.** To create a transcriptional fusion of the *mytA*-NCgl2775-NCgl2776 operon to *lacZ*, we used pCGL529, a derivative plasmid of pMF2 that contains the *lacZ* operon and can be used for integration at the *icd* locus for single-copy reporter fusion, as previously described (43). A fragment containing the *P<sub>op</sub>* promoter (271 bp) was amplified from *C. glutamicum* chromosomal DNA by using primers MytA-F (5'-TCTTG CGAATTCGCGGTGGCATTG-3') and MytA-R (5'-ATGCGGGATCCCC CATGAAGTTTTC-3') and cloned into pCGL529 to give an in-frame fusion of *P<sub>op</sub>* and *lacZ*. The resulting plasmid (pCGI529Pop) was transferred into *C. glutamicum* ATCC 13032 by electroporation, leading to its integration into the chromosome at either the *icd* locus or the *mytA*-NCgl2775-NCgl2776 locus. Km-resistant clones were analyzed by PCR to determine the exact localization of the inserted plasmid. One recombinant strain that has pCGI529Pop inserted by homologous recombination at the *icd* locus was used for further study.

**RNA isolation, RT-PCR, and transcriptional activity measurement.** Total RNA was extracted from an exponentially growing *C. glutamicum* culture at 30°C



as described previously (27). Reverse transcription (RT) was performed using Transcriptor reverse transcriptase (Roche) according to the manufacturer's recommendations and DNase- and RNase-free (Roche). Total RNA was transcribed into cDNA by using primer 2775CLrev (5'-GGTCGCCCAATCCACA ACCC-3'). The RT step was carried out at 50°C for 1h 30 min, followed by a period of 10 min at 85°C to inactivate the reverse transcriptase. The cDNA was used for PCR amplification with primers 2775CLrev and 2776CL (5'-TACGCA ACTCTCGCTCCGG-3') or 2776CLrev (5'-CCGCAGATTCCTCAGCAGC G-3') and PS1A (5'-GCTCAGTCCAGCAACCTT-3'). As a control reaction, the same experiment was performed without reverse transcriptase.

**$\beta$ -Galactosidase assay.**  $\beta$ -Galactosidase activity was measured in cytosolic extracts as described previously (43). The protein concentration of the extracts was determined by the Bradford method (Bio-Rad protein assay). Specific activity was expressed as  $A_{420} \text{ min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ .

**Stress conditions.** Stress experiments were performed with mid-exponential-phase cultures (optical density at 600 nm  $[\text{OD}_{600}] = 5$ ). Cells were collected by centrifugation (4,000 rpm for 10 min at 4°C), and aliquots were resuspended under different conditions. For heat shock experiments, the cultures were resuspended in the growth media set at 42°C. For acid and alkaline stresses, the cultures were resuspended in the growth media at pH 5 and pH 9. For oxidative stress, hydrogen peroxide (10 mM) was added to the media. For hyperosmotic stress, cells were added to media containing 1 M NaCl. Finally, for nutritional stress, cells were resuspended in a 50 mM phosphate buffer, pH 8.

In all experiments, transcriptional activity (i.e.,  $\beta$ -galactosidase activity) was measured after 2.5 h of incubation under the stress condition at 30°C.

Heat shock (42°C or 50°C) and cold shock (melting ice, 0°C) experiments were performed as described above, and transcriptional activity (i.e.,  $\beta$ -galactosidase activity) was measured as a function of time exposure.

**Heat stress resistance assay and survival.** For mild-temperature stress, bacteria that had been cultured at mid-exponential phase at 30°C were placed under 42°C or 45°C conditions without any treatment for about 18 h (without shaking) and then replaced in culture conditions at 30°C or 10-fold dilution series were made from  $\text{OD}_{600}$  of 1 to 0.00001, and 10  $\mu\text{l}$  of each was spotted onto BHI agar plates and incubated at 30°C.

For high-temperature stress, 1 ml of bacteria cultured at mid-exponential phase at 30°C was placed in a prewarmed tube and incubated at 50°C for 0, 15, 30, 45, or 60 min. Surviving cells were enumerated on BHI agar plates, and the surviving fraction was expressed as the percentage of the viable cell count before heat challenge.

**Extraction and quantification of lipids.** Lipids were extracted from wet cells for 16 h with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (1:2, vol/vol) at room temperature, as described previously (37); the cells were reextracted with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (1:1, vol/vol) and  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (2:1, vol/vol) for 16 h. The three organic phases were pooled and concentrated by means of rotary evaporation. The crude lipid extracts were partitioned between the aqueous and the organic phases arising from a mixture of  $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$  (1:1, vol/vol). The lower organic phases were collected and evaporated to dryness to yield the crude lipid extracts from each strain. Subsequently, they were comparatively examined using thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated plates of 0.25-mm thickness (Durasil-25; Macherey-Nagel) developed with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (30:8:1 or 65:25:4, vol/vol/vol). Glycolipids were detected by spraying plates with 0.2% anthrone in concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , followed by heating.

The corynomycolate contents of extractable lipids and delipidated cells were determined in at least three independent experiments as follows. Lipid extracts (100 mg) and delipidated cells of the various strains were dried under a vacuum, weighed, and saponified (10); the saponified products were then acidified with 20%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The resulting FA were extracted with diethyl ether, washed with water, converted to methyl esters with diazomethane and dried under a vacuum, and weighed. The FA methyl esters were separated from contamination on a silica gel column irrigated with different concentrations of diethyl ether in petroleum ether (0, 5, 10, 20, and 100%, vol/vol). Fractions were analyzed by TLC and developed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Lipids were detected by spraying plates with rhodamine B, and fractions containing FA or corynomycolates were pooled and weighed.

Gas chromatography (GC) analysis was also used to determine FA and corynomycolate composition. After saponification and methylation, the mixture of FA methyl esters and corynomycolic methyl esters were treated with trimethylsilyl reagents to derivatize hydroxylated components of the mixtures, i.e., corynomycolates, and analyzed by GC. The detector response for the various classes of FA methyl esters was determined using authentic samples of  $\text{C}_{16:0}$  and  $\text{C}_{32:0}$  corynomycolate methyl esters. Quantification of nonhydroxylated FA methyl esters and corynomycolate derivatives was achieved by GC chromatogram analysis.

GC of the FA methyl ester mixture was performed using a Hewlett Packard HP4890A chromatograph equipped with a fused silica capillary column (25-m length by 0.22-mm inside diameter) containing WCOT OV-1 (0.3-mm film thickness, spiral). A temperature gradient of 100 to 300°C at 5°C  $\text{min}^{-1}$ , followed by a 5-min isotherm plateau at 300°C, was used.

**Protein purification.** All steps were done at 4°C. Crude cell extracts were prepared from 24-h-grown cultures of strain  $\Delta 2775(\text{NCgl}2775)$ . Cells were harvested (8,000  $\times g$  for 15 min), washed once with water, and resuspended in a 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu\text{g/ml}$  DNase, and 1  $\mu\text{g/ml}$  RNase. Cells were broken using a French pressure cell (18,000  $\text{lb/in}^2$ ). EDTA (0.5 mM) and dithiothreitol (DTT; 1 mM) were added to the broken cells. Unbroken cells were removed by centrifugation (8,000  $\times g$  for 15 min). Membrane vesicles and soluble fractions were separated by centrifugation at 245,000  $\times g$  for 60 min. The membrane pellet was resuspended in a 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM EDTA, and 1 mM DTT. Removal of peripheral membrane proteins was performed by incubating membrane vesicles in ice for 1 h with 6 M urea. After centrifugation (245,000  $\times g$  for 60 min), the pellet was resuspended in a 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, and Triton X-100 (final concentration, 1%) in order to solubilize membrane proteins. The suspension was incubated for 1 h, and the insoluble material was removed by centrifugation (245,000  $\times g$  for 60 min). NaCl was added to the detergent-solubilized proteins to a final concentration of 20 mM, and the protein extract was applied onto a DEAE Sephacel exchanger (Sigma) equilibrated with a 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 20 mM NaCl and 1% Triton X-100. The column was washed with the equilibration buffer and then with the same buffer containing 50 mM NaCl. The bound proteins were eluted with a 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 250 mM NaCl and 0.1% Triton X-100. This fraction ( $f_{250+}$ ), which contained the *p*-nitrophenyl (*p*NP)-decanoate (*p*NPD) activity, was selected for *in vitro* analyses. Desalting and determination of the concentrations of the proteins contained in  $f_{250+}$  were performed with Centriprep concentrator 30 (Amicon). The same purification procedure was applied to  $\Delta 2775$  cultures. The fraction eluted from the DEAE Sephacel exchanger with 250 mM NaCl ( $f_{250\Delta}$ ) was recovered and used as a control for all *in vitro* analyses.

**Enzymatic assays.** Fatty acid esterase activity was measured spectrophotometrically by monitoring the release of *p*-nitrophenol ( $\epsilon_M$  [molar extinction coefficient] = 15,000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) from *p*NP esters of butyrate (*p*NPB; Sigma), decanoate (*p*NPD; Sigma), and palmitate (*p*NPP; Sigma) as substrates. The assay mixture contained 50 mM phosphate buffer and 0.25% Triton X-100 and *p*NPB (0.1 to 2 mM), *p*NPD (25  $\mu\text{M}$  to 1.5 mM), or *p*NPP (25  $\mu\text{M}$  to 0.25 mM). Thioesterase activity was assayed spectrophotometrically by following the release of coenzyme A (CoA) from acyl-CoA reacting with DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Sigma] releasing 5-thio-2-nitrobenzoate ( $\epsilon_M = 13,700 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [at 410 nm]). The assay mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 8), 0.46 mM DTNB, and palmitoyl-CoA (Sigma) at various concentrations (8  $\mu\text{M}$  to 250  $\mu\text{M}$ ). Assays were done in 96-well plates (path length, 0.8 cm), in a 200- $\mu\text{l}$  reaction volume. For kinetic parameter determination, the reaction was started by addition of 100  $\mu\text{l}$  of the assay mixture containing the substrate at the appropriate concentration to 100  $\mu\text{l}$  of 50 mM phosphate buffer (pH 8) containing 0.1% Triton X-100 and 0.30, 0.45, or 0.75  $\mu\text{g}$  of the protein mixture from  $f_{250+}$  or  $f_{250\Delta}$ . The contents were incubated at 37°C, and the reaction was followed spectrophotometrically at 410 nm for 30 min. The protein concentration of the extracts was determined by the Bradford method (Bio-Rad protein assay). Kinetic constants ( $K_m$  and  $V_{\text{max}}$ ) were obtained by nonlinear curve fitting using the software Origin7 (OriginLab).

## RESULTS

**Genetic organization of the Rv3802c locus in *Corynebacteri-  
nae*.** As shown in Fig. 1, the Rv3802c gene is localized just upstream of the three genes (*pks13*, *accd4*, and *fadD32*) whose products are required for the final condensation step of mycolate biosynthesis (35, 36). A search for homologous proteins showed that the Rv3802 protein is present in all the members of the *Corynebacteri-  
nae* suborder but not in other bacteria. Its corresponding *C. glutamicum* ortholog gene is annotated as NCgl2775 (Fig. 1). Amino acid sequences of Rv3802 protein orthologs are very well conserved, with a predicted cutinase motif (PFAM accession number PF01083) (4) and a predicted

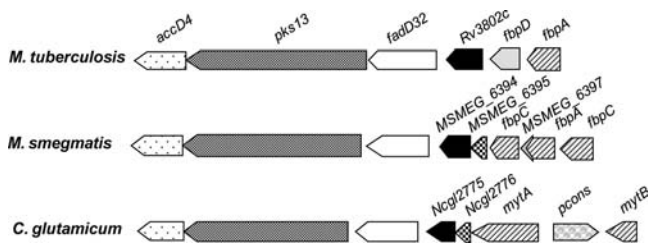


FIG. 1. Genetic organization of the Rv3802c or NCgl2775 locus. Genetic organization of the Rv3802c loci in *M. tuberculosis* (NC\_000962.2), *M. smegmatis* (NC\_008596.1), and *C. glutamicum* (NC\_003450). This locus is part of a larger cell wall biosynthesis gene cluster conserved in all *Corynebacterineae*. *pcons*, NCgl2778 encoding a conserved hypothetical protein.

signal sequence followed by a proline-rich region. In both *C. glutamicum* and *M. smegmatis*, but not in *M. tuberculosis*, the Rv3802c gene ortholog is preceded by a small ORF (the NCgl2776 gene in *C. glutamicum*) that would encode a protein of unknown function. Because of the small intergenic distances between these two genes in the different genomes, it is very likely that, when present, the gene pair forms an operon. In all *Corynebacterineae*, two or more genes encoding mycolyltransferases are found upstream of these ORFs. In *C. glutamicum*, like in other corynebacteria (except in *C. ulcerans*), the very small distances between *mytA* and the NCgl2776 gene and between NCgl2776 and NCgl2775 genes (five and six nucleotides, respectively) strongly suggest that these three genes form a polycistronic transcriptional unit. To test this hypothesis, RT-PCR was performed on total RNA by using primer pairs

designed to span the putative operon, giving overlapping amplification products. RT amplification products were observed with each primer pair used, showing that, as expected, these genes are transcriptionally linked (data not shown).

**Essentiality of the Rv3802c gene orthologs.** In their screening by transposition insertion experiments for genes that impair growth in *M. tuberculosis* and *M. bovis*, Sassetti et al. annotated the Rv3802c gene as a probable essential gene (40). However, as presumption of essentiality did not always work with mycobacteria, we tentatively deleted the Rv3802c ortholog (the MSMEG\_6394 gene) in *M. smegmatis*. First, a merodiploid strain was generated by single crossover between the wild-type chromosomal MSMEG\_6394 allele and a mutated allele carried by a nonreplicative plasmid containing the counterselectable marker *sacB* (PMM87) (Fig. 2). Attempts to select the allelic exchange mutant by plating a culture of PMM87 on solid LB medium containing Suc and Hyg failed, suggesting that null mutation of the MSMEG\_6394 gene might be lethal for *M. smegmatis* on the growth condition tested. To validate the assumption, a functional copy of this gene was then provided *in trans* on a thermosensitive mycobacterial plasmid. Selection of Suc<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup> clones at 32°C allowed the isolation of a conditional mutant, named PMM88, in which the MSMEG\_6394 chromosomal allele was disrupted by the Hyg resistance cassette and a functional copy of this gene was expressed from the thermosensitive plasmid (Fig. 2). Striking this recombinant strain on Hyg-containing plates at 32°C or 42°C revealed that it grew as a single-crossover mutant at 32°C but was unable to form colonies at the high temperature (Fig. 2). These data demonstrated that, as expected, the MSMEG\_

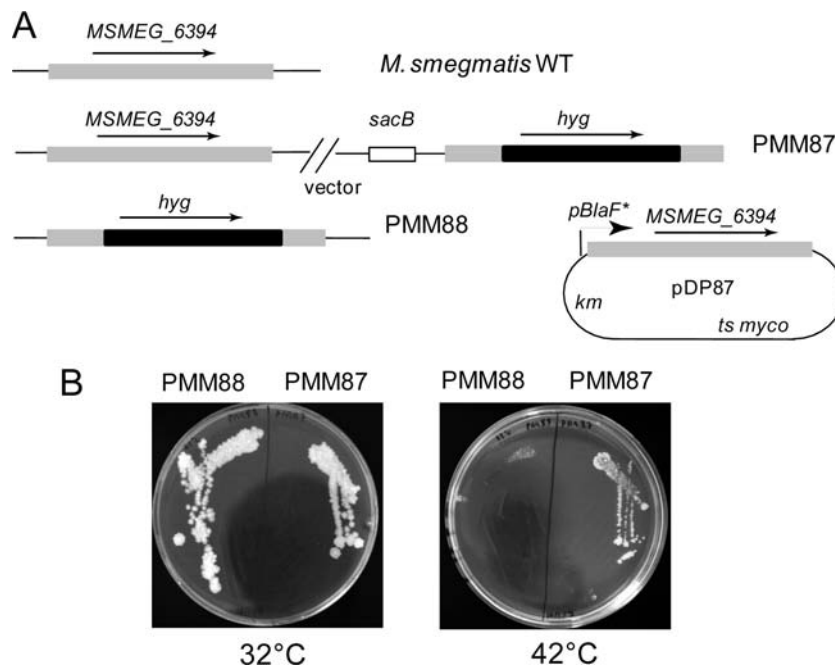


FIG. 2. Construction of a conditional mutant of *M. smegmatis*. (A) Schematic representation of the MSMEG\_6394 gene locus in the wild-type (WT) mc<sup>2</sup>155 strain and in the recombinant strains PMM87 and PMM88. The gray box represents the MSMEG\_6394 wild-type allele targeted by allelic exchange, and the black box represents the Hyg resistance cassette used for the disruption. *ts myco*, temperature-sensitive mycobacterial plasmid. (B) Growth of the recombinant strains PMM87 and PMM88 after restreaking on Hyg-containing plates and incubation at a permissive (32°C) or nonpermissive (42°C) temperature for plasmid pDP87 replication.

6394 gene is essential for the survival of *M. smegmatis* under these conditions.

In contrast to what was observed for *M. smegmatis*, a *C. glutamicum* deletion mutant ( $\Delta 2775$ ) in which the entire NCgl 2775 gene was replaced by a Km resistance cassette (*aphIII*) via a double crossover was easily obtained. The allelic replacement of the wild-type copy of the gene with the mutated one was verified by PCR using appropriate combinations of primers (data not shown).

**Investigation of the putative role of the Rv3802 ortholog in MA biosynthesis.** In view of the genetic context of Rv3802c, it was tempting to postulate that the gene product is involved in MA metabolism. This hypothesis is supported by the recent data showing that in vitro the esterase activity of the Rv3802 protein can be inhibited by tetrahydrolipstatin, an antituberculous compound with an unknown mechanism but that causes a decrease in the production of MA (32). However, there is no experimental evidence for a specific function of this protein in MA biosynthesis in vivo. Accordingly, on account of the non-essentiality of the NCgl2775 gene, we investigated the possible involvement of the gene product in MA metabolism. In comparison to the wild-type strain, the  $\Delta 2775$  mutant exhibited no significant phenotypic changes and had similar growth patterns at 30 and 34°C. A detailed comparative lipid analysis of  $\Delta 2775$  and the wild-type strain was then performed using bacterial cultures grown at 30°C. Lipids extracted with organic solvents were analyzed by TLC and quantified by being weighed. Concomitantly, cell wall-linked corynomycolates were isolated from delipidated cells, purified by chromatography, and weighed. The extractable lipids from the two strains exhibited qualitatively similar profiles; they consisted mainly of trehalose monocorynomycolate (TMCM), trehalose dicorynomycolate (TDCM), and phospholipids (data not shown). Likewise, no significant differences were observed between the  $\Delta 2775$  and wild-type strains in terms of amounts of corynomycolates esterifying trehalose, i.e., TMCM and TDCM, or of corynomycolates covalently bound to arabinogalactan.

Nevertheless, it was possible to further explore the function of the protein by overexpressing Rv3802 orthologs and comparing the lipid profiles of the wild type,  $\Delta 2775$ ,  $\Delta 2775$ (NCgl 2775), and  $\Delta 2775$  in which the MSMEG\_6394 gene was overexpressed [ $\Delta 2775$ (MS6394)]. While no significant difference between the amounts of covalently linked corynomycolates of the different strains could be detected (data not shown), quantitative determination of the extractable lipids of the various corynebacterial cells indicated that the two overproducing strains [ $\Delta 2775$ (NCgl2775) and  $\Delta 2775$ (MS6394)] exhibited the same behavior and accumulated more trehalose corynomycolates (about a 30% increase) and elaborated fewer phospholipids (about a 15% decrease in the amount of FA relative to the levels for the parent strains [wild type and  $\Delta 2775$ ]) (Fig. 3). As a result, the ratios of MA to FA, which were very similar for the wild-type and the  $\Delta 2775$  strains, were almost two times higher for the overproducing strains than for the wild-type and the  $\Delta 2775$  strains (Fig. 3). Thus, the overexpression of Rv3802 orthologs, the NCgl2775 and MSMEG\_6394 genes, in *C. glutamicum* clearly impacts on the lipid composition of the resulting overexpressing strains.

**Induction of the NCgl2775-NCgl2776-*mytA* operon by stress conditions.** Taken together, the results described above

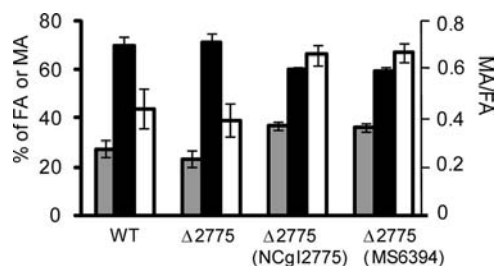


FIG. 3. Lipid analyses of the different strains at 30°C. Cells from the wild type (WT),  $\Delta 2775$ ,  $\Delta 2775$ (NCgl2775), and  $\Delta 2775$ (MS6394) were grown to mid-exponential phase at 30°C and collected, and lipids were extracted and quantified as described in Materials and Methods. MA (gray bars) and FA (black bars) were expressed as percentages of total extractable lipids, and the ratios of these (white bars) were deduced. Values are means of three independent determinations  $\pm$  standard deviations.

strongly suggest that under normal growth conditions, the NCgl2775 gene has no detectable contribution to MA biosynthesis in *C. glutamicum*. They also point to a possible role of the protein under defined conditions, e.g., overexpression. To determine whether the NCgl2775 protein might function only in specific environmental conditions, we investigated the transcriptional activity of the NCgl2775-NCgl2776-*mytA* operon promoter ( $P_{op}$ ) under different stress conditions. For that purpose, a transcriptional fusion of a DNA fragment corresponding to the 355 bp upstream of the start codon of *mytA* and the promoterless *lacZ* gene ( $P_{op}$ -*lacZ*) was constructed and inserted into the bacterial chromosome of the wild-type strain at the *icd* locus. To measure  $P_{op}$  activity, cells harboring the  $P_{op}$ -*lacZ* construct were grown at 30°C in the exponential phase, harvested by centrifugation, and subjected to various stress conditions. No change in  $\beta$ -galactosidase expression was seen after 2.5-h exposure to cold, hypo-osmotic, or hyperosmotic shock, acidic or alkaline pH, or hydrogen peroxide and carbon starvation relative to that under unexposed control conditions (data not shown). The only condition tested that led to a significant change in  $\beta$ -galactosidase expression was exposure to an elevated temperature (42°C). We thus performed a kinetic experiment of  $P_{op}$ -*lacZ* expression following a temperature shift from 30°C to 42°C. We observed that induction was relatively slow and increased at least until 3 h at a level approximately threefold higher than that of the control (Fig. 4). Similar results were obtained when the temperature was raised from 30°C to 50°C. These data indicated that the NCgl2775 gene, like the NCgl2776 and *mytA* genes, are upregulated during heat stress.

**Effects of NCgl2775 gene deletion on growth and heat resistance.** The heat response of NCgl2775 gene expression led us to investigate the behavior of the  $\Delta 2775$  mutant strain under heat stress conditions. We first examined its growth kinetics over the 30-to-42°C temperature range. For this purpose, fresh medium was inoculated with cells grown overnight at 30°C. Growth of the mutant was indistinguishable from that of the wild type at temperatures up to 40°C, which is the upper limit of the normal growth temperature for *C. glutamicum* (data not shown). Growth deficiency became apparent when the temperature was raised to 41°C. Under this stress condition, the mutant strain displayed a slight growth defect that was detectable

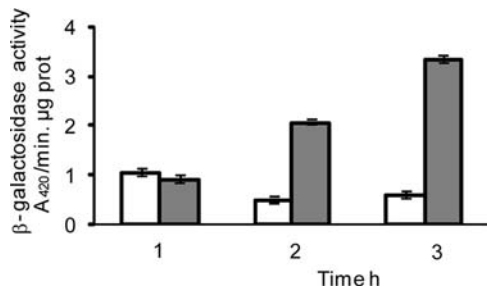


FIG. 4. Expression of  $P_{op}$  under heat stress conditions. The reporter strain contains the promoter region of the NCgl2775-NCg2776-*mytA* operon ( $P_{op}$ ) fused to the *lacZ* gene. The strain was grown at 30°C at mid-exponential phase and divided into two samples (time zero). One was incubated at 30°C (white bars) and the other at 42°C (gray bars).  $P_{op}$  expression was quantified for each sample at 1, 2, and 3 h by determining the  $\beta$ -galactosidase activity as described in Materials and Methods. Values are means of three determinations  $\pm$  standard deviations. prot, protein.

3 h after the beginning of culture (data not shown). This growth defect was much more visible at 42°C, as the  $\Delta 2775$  strain stopped growing after about one generation (Fig. 5A). Surprisingly, complementation of the NCgl2775 mutant strain [ $\Delta 2775$ (NCgl2775) strain] resulted in growth that was slightly slower than those of the mutant and wild-type strains at tem-

peratures above 37°C (data not shown). The reason for this growth defect is unclear but could be due to the high level of NCgl2775 protein produced by the strain (see below), which could be toxic under elevated growth temperature conditions. As expected from its behavior at elevated temperatures, the complemented strain did not restore the temperature effect (Fig. 5A).

We next examined the ability of the cells to survive and grow after a heat challenge at mild ( $\leq 45^\circ\text{C}$ ) and high temperatures ( $\geq 50^\circ\text{C}$ ). Mild temperatures are defined as conditions in which a significant fraction of the *C. glutamicum* population can survive at least 24 h, whereas high temperatures are conditions under which all the bacteria are killed in 1 h or less. Cells from exponentially growing cultures at 30°C were diluted in fresh BHI medium, incubated 16 h at 42°C and then cultivated again at 30°C. A significant increase in the delay of the recovery period before growth resumption was systematically observed for the  $\Delta 2775$  relative to the parental strain (Fig. 5B). This difference in growth retardation was not due to a difference in the number of viable cells, since bacterial viability was not affected by the exposure at 42°C (data not shown). However, when the same experiment was performed at 45°C instead of 42°C, a loss in bacterial viability of 50- to 100-fold was consistently observed for the  $\Delta 2775$  strain relative to the level for the wild-type strain (Fig. 5C). Again, these effects could not be

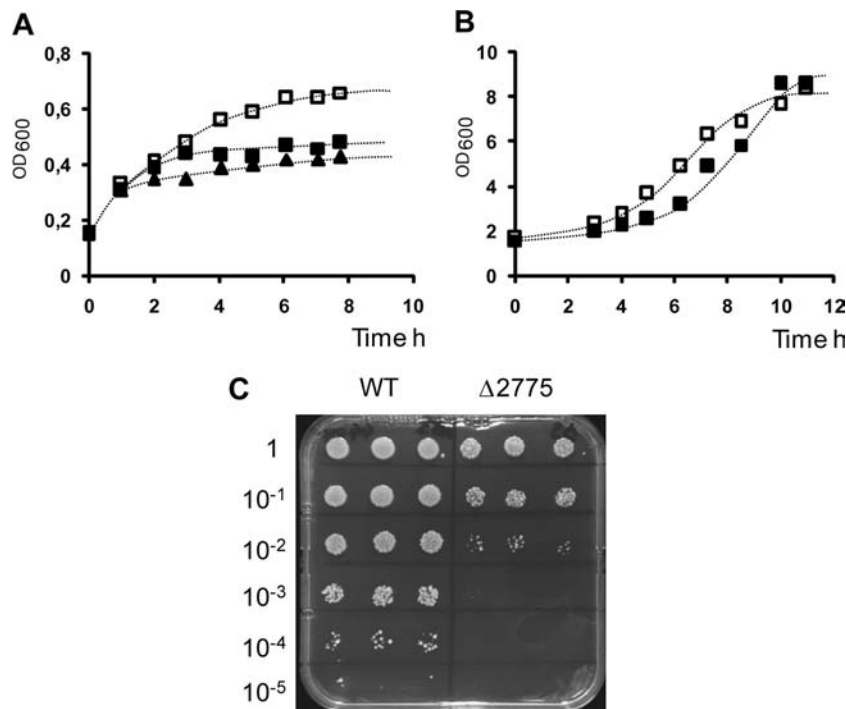


FIG. 5. Effects of mild temperature on growth and heat resistance. (A) Stationary-phase cells from the wild-type (WT; open squares),  $\Delta 2775$  (filled squares), and  $\Delta 2775$ (NCgl2775) (filled triangles) strains grown at 30°C were diluted directly into fresh medium and transferred to 42°C. Growth was monitored by  $\text{OD}_{600}$  measurements. (B) Cells from the wild type (WT; open squares) and  $\Delta 2775$  (filled squares) grown to mid-exponential phase at 30°C were diluted into fresh BHI medium ( $\text{OD}_{600} = 1$ ), shifted to 42°C for 16 h without shaking, and then transferred again to 30°C under culture conditions. Growth recovery at 30°C was monitored by  $\text{OD}_{600}$  measurements. (C) Cells from the wild type (WT) and  $\Delta 2775$  grown to mid-exponential phase at 30°C were diluted directly into fresh BHI medium at an  $\text{OD}_{600}$  of 1 (corresponding to  $10^8$  bacteria/ml), shifted to 45°C for 16 h without shaking, and spotted ( $10 \mu\text{l}$ ) onto BHI agar plates at different bacterial dilutions (0 to  $10^{-5}$ ). The absence of growth during the incubation period at 45°C was checked before spotting. Plates were incubated at 30°C, and growth was visualized 48 h after spotting. All the data are representative of the results for three independent experiments.

complemented by the overexpression of the NCgl2775 protein in the mutant strain. In contrast to what was observed at 45°C, no significant difference in the survival rate of bacteria could be detected between the two strains after exposure at 50°C (data not shown). Altogether, these results indicated that the NCgl2775 protein is involved in both bacterial resistance and viability following a heat insult but only when temperature conditions are not too severe. This conclusion is consistent with the very slow kinetic of the transcriptional activity we observed for the NCgl2775 promoter ( $P_{op}$ ) (Fig. 4) that must be compared to the time course of survival at mild temperatures (several hours or days), while killing of bacteria takes minutes at high temperatures.

**Effect of the NCgl2775 gene deletion on the lipid envelope composition at high temperature.** Temperature is known to significantly affect the content and composition of microbial lipids in response to variations in membrane fluidity. In this context, considering the effects of a long exposure at temperatures higher than 40°C on the  $\Delta 2775$  mutant, we investigated a possible role of NCgl2775 in lipid metabolism in response to thermal stress. The *C. glutamicum* lipidome comprises principally corynomycolates esterifying trehalose (TMC and TDCM) and arabinogalactan and three GPL classes, namely phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, and cardiolipin (31, 37). We thus analyzed the effect of a growth at 42°C on FA and MA compositions. As palmitoyl ( $C_{16:0}$ ) and oleoyl ( $C_{18:1}$ ) constitute 95% of the fatty acyl moieties of *C. glutamicum* ATCC 13032 GPL (31), determination of the  $C_{16:0}/C_{18:1}$  ratio (rFA) is a good index of the balance between saturated and unsaturated FA and of the amount of GPL. Similar ratios were observed for the wild-type and mutant strains cultivated either at 30°C (rFAs of  $0.85 \pm 0.12$  for the wild type and  $0.79 \pm 0.15$  for  $\Delta 2775$ ) or at 42°C (rFAs of  $0.67 \pm 0.19$  for the wild type and  $0.85 \pm 0.21$  for  $\Delta 2775$ ).

*C. glutamicum* ATCC 13032 (wild type) synthesizes different classes of corynomycolates, mainly  $C_{32:0}$ ,  $C_{34:0}$ , and  $C_{34:1}$  and, to a lesser extent,  $C_{36:2}$ ,  $C_{36:1}$ , and  $C_{36:0}$ . At 30°C, the ratios of saturated corynomycolates to unsaturated corynomycolates (rMA) are  $1.04 \pm 0.1$  for the wild type and  $1.02 \pm 0.33$  for  $\Delta 2775$ . Interestingly, and in sharp contrast with what was observed for GPL, culturing *C. glutamicum* at 42°C had a drastic effect on the balance between saturated and unsaturated mycolates for the wild-type strain (rMA =  $3.88 \pm 0.27$ ). A similar effect was observed for the mutant strain (rMA =  $3.95 \pm 1.25$ ). It is unlikely that these quantitative modifications are accompanied by structural changes (e.g., length of mycolates), as no shift of the amounts of  $C_{32}$ ,  $C_{34}$ , and  $C_{36}$  could be observed while increasing the growth temperature either for the wild type or the  $\Delta 2775$  strain (data not shown).

Modification of MA composition was not the only change induced by the temperature; we also observed an important variation in the MA/FA ratio. This ratio, which represents the amounts of TDCM and TCM relative to GPL, increased about seven times for the wild-type strain ( $7.4 \pm 2.6$ ) when the temperature was increased from 30°C to 42°C. In contrast, the same stress conditions caused only a threefold increase in the MA/FA ratio for the  $\Delta 2775$  strain ( $2.8 \pm 1.05$ ). Taken together, these results indicated that an important reorganization of the outer membrane lipids occurred when *C. glutamicum* was exposed to high temperatures and that the NCgl2775

TABLE 1. Hydrolysis activity of pNPD in the wild type,  $\Delta 2775$ , and the overexpressing  $\Delta 2775$ (NCgl2775) strain<sup>a</sup>

Strain	Sp act (nmol of pNP/min/mg proteins)	
	Cells	Supernatant
WT	0.28	5.4
$\Delta 2775$	0.19	4.3
$\Delta 2775$ (NCgl2775)	31.2	11

<sup>a</sup> Stationary-phase cultures were centrifuged, the pellet was resuspended in 50 mM phosphate buffer, and the cells were broken using microbeads. pNPD (0.25 mM) activity was measured using the broken cell extract and the culture supernatant as protein sources. WT, wild type.

protein was involved in this process. Based on the data obtained by overexpressing the NCgl2775 or MSMEG\_6394 gene at 30°C (see above), which has an effect on lipid composition quite comparable to that of an elevated growth temperature, these results are in agreement with a mechanism in which an increase in temperature induces an overexpression of the NCgl2775 protein, resulting in turn in a modification of the balance between trehalose corynomycolates and GPL.

**Partial purification of the NCgl2775 protein from *C. glutamicum*.** Though our results clearly demonstrated that the NCgl2775 protein is involved in the cell wall lipid modifications related to heat stress management, we decided to perform an in vitro analysis of the enzymatic activity(ies) of the NCgl2775 protein in order to gain insights into its possible mechanism of action. According to the esterase/cutinase characteristics of the Rv3802 protein family, and because cutinases display hydrolytic activity toward a broad variety of esters, which include soluble synthetic esters, we tested pNP esters of FA as substrates (8). Preliminary experiments performed on whole-cell extracts (after lysis by microbead treatment) and culture supernatants of wild-type and  $\Delta 2775$  cultures showed that most of the hydrolysis activity of pNPD occurred in the culture supernatant (Table 1). Only a small difference between the hydrolysis activities of the wild-type and  $\Delta 2775$  strains was detected, in both fractions, indicating that *C. glutamicum* possesses another esterase(s), besides NCgl2775, mainly secreted. The same experiment performed on  $\Delta 2775$ (NCgl2775) showed that the overexpression of NCgl2775 in *C. glutamicum* resulted in a >100-fold increase in the hydrolysis activity of pNPD, essentially in the cell extract (Table 1). The purification procedure and hydrolysis activity observed with pNPD, used as the substrate, at each purification step are summarized in Table 2. As can be seen, the pNPD activity was clearly associated with the French press membrane vesicle fraction. Treatment of these vesicles with 5 M urea did not extract the protein in contrast to 1% Triton X-100, which fully solubilized pNPD activity. The Triton X-100 extract was then subjected to DEAE Sephacel chromatography, and the pNPD activity was found to elute with a 250 mM NaCl concentration. Thereafter, this fraction containing the NCgl2775 gene was named *f250+*. As a control, the same purification procedure was performed using the  $\Delta 2775$  strain as starting material (Table 2). Comparison of the DEAE fraction *f250+* with the same fraction from the control (*f250Δ*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a broad but intense band at around 40 kDa, corresponding to the NCgl2775 protein, which was subsequently used for enzymatic measurements. It should be

TABLE 2. Partial purification of NCgl2775<sup>a</sup>

Strain	Sp act (nmol of pNP/min/mg proteins)			
	Cytoplasmic fraction <sup>b</sup>	Vesicles	Triton extract <sup>c</sup>	DEAE Sephacel <sup>d</sup>
$\Delta 2775$	0.3	0.5	1.07	0
$\Delta 2775(\text{NCgl}2775)$	4.2	22.4	67.0	166.5

<sup>a</sup> NCgl2775 was purified from the  $\Delta 2775(\text{NCgl}2775)$  strain as described in Materials and Methods. The  $\Delta 2775$  strain was used as a control. The presence of the protein was monitored by pNPD (0.25 mM) hydrolysis in the different fractions.

<sup>b</sup> Fractions obtained after use of French press and ultracentrifugation.

<sup>c</sup> Fractions obtained after urea and Triton X-100 treatment of the French press vesicles.

<sup>d</sup> Fractions eluted from DEAE Sephacel chromatography with 250 mM NaCl and after desalting and determination of the concentration. These fractions correspond to *f250+* [ $\Delta 2775(\text{NCgl}2775)$ ] and *f250 $\Delta$*  [ $\Delta 2775$ ].

noted that the apparent molecular mass of the NCgl2775 protein is greater than the calculated mass of the deduced amino acid sequence (32,615 Da). Our purification procedure showed that the NCgl2775 protein is associated with a membrane fraction and could be solubilized only by added detergent, a result consistent with the NCgl2775 protein being anchored in the membrane. The hydrophobicity profile of the NCgl2775 protein predicts only one N-terminal transmembrane segment (residue 5 to 27) that is also predicted as a possible signal sequence with a more probable signal peptidase cleavage site located between residues 24 and 25 or 27 and 28 (SignalP3.0 and LipoP1.0). No lipid attachment site in NCgl2775 could be predicted (LipoP1.0 and DOLOP).

**In vitro activity of NCgl2775.** During the course of this work, two studies involving independent functional analyses of the recombinant His-tagged Rv3802 protein have been published (32, 49). Taken together, these reports showed that Rv3802 possesses in vitro esterase, thioesterase, and phospholipase activities. On the basis of the huge difference observed between the  $K_m$  values of an esterase substrate (pNPB;  $K_m = 23.5$  mM) and a thioesterase substrate (palmitoyl-CoA;  $K_m = 50$   $\mu$ M), it was proposed that the Rv3802 protein could be a thioesterase in vivo (32). Considering the difference in acyl chain length of the substrates used in that study ( $C_4$  versus  $C_{16}$ ), we chose to compare the NCgl2775 hydrolysis activities of different pNP esters of FA (pNPB  $C_4$ , pNPD  $C_{10}$ , and pNPP  $C_{16}$ ) with that of palmitoyl-CoA ( $C_{16}$ ). For this purpose, time-dependent hydrolysis of substrates was measured using *f250+* and *f250 $\Delta$*  as enzyme sources. As *f250+* was active toward all the substrates tested and *f250 $\Delta$*  was inactive in all assays, we deduced that the measured kinetic values reflected the NCgl 2775 activity alone. Kinetic parameters are given in Table 3 (those for pNPB, which exhibited a non-Michaelian behavior under our conditions, are not shown). Identical  $V_{\max}$  values were obtained for pNPP and palmitoyl-CoA, while a very slight difference between  $K_m$  values (a factor of 3) was observed. As the two substrates share the same acyl chain (palmitoyl) and thus are especially appropriate for discrimination between a thioesterase and an esterase function, we concluded that the small difference observed between the kinetic parameters of these substrates is not sufficient to favor a thioesterase activity rather than an esterase one. Besides, similar values of  $K_m$  and  $V_{\max}$  were also obtained for pNPP and pNPD, indicating that,

TABLE 3. Kinetic parameters of NCgl2775

Compound	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>	
	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{\max}$ (nmol of pNP)
pNPD	253 $\pm$ 31	180 $\pm$ 12
pNPP	147 $\pm$ 21	260 $\pm$ 17
Palmitoyl-CoA	50 $\pm$ 9	340 $\pm$ 58

<sup>a</sup> Kinetic parameters were measured as described in Materials and Methods. Values are means of three determinations  $\pm$  the standard deviation.

in the  $C_{10}$ -to- $C_{16}$  range, the acyl chain length has a very small influence, if any, on the enzyme affinity and turnover. Finally, the temperature (20, 30, or 42°C) had no influence on NCgl 2775 activity with pNPD as the substrate (data not shown).

## DISCUSSION

In this study, we examined the in vivo function of the *C. glutamicum* ortholog of the Rv3802 protein, the NCgl2775 protein, and found that it is involved in the reorganization of outer membrane lipid composition following heat stress. When subjected to temperatures greater than their physiological growth temperature, bacteria have to cope with membrane fluidization that can alter essential physiological functions (11, 17, 42, 45). For bacteria possessing two membranes, the outer one is the first component that suffers damage. This is illustrated by the important disorganization and drastic increase in permeability that occur in the outer membrane of *E. coli* after a severe heat shock (18, 41, 48). Although it is obvious that changes must occur to prevent or repair membrane alterations due to heat treatment, the nature and mechanisms of these modifications are poorly documented in the case of the bacterial outer membrane. In the present study, we showed that important changes are induced in the outer membrane of *C. glutamicum* in response to mild heat exposure (42°C). First, the ratio of saturated MA to unsaturated MA increases by a factor 4. A change in the saturated-to-unsaturated FA balance is a common mechanism used by various organisms to adjust the fluidity of their plasma membranes in response to temperature variations. *C. glutamicum* uses this mechanism to decrease the viscosity of its outer membrane but not that of its inner one, as no change in the GPL acyl chain composition could be detected after several hour of exposure to heat. This result is in agreement with the results of Özcan et al., who showed that the  $C_{16:0}/C_{18:1}$  ratio remained unchanged when *C. glutamicum* bacteria were grown at 30°C, 37°C, and 40°C (31). Second, the ratio of extractable MA (TDCM and TMCM) to FA also increases drastically. Noncovalently linked corynomycolates have been postulated to participate with GPL in the structure of both leaflets of the corynebacterial outer membrane (37, 50). Our results strongly suggest that following a heat challenge, the balance between these two classes of lipids is modified inside the outer membrane. The physiological effect of this membrane remodeling is not clear. Indeed, while trehalose corynomycolates, which are  $C_{32}$ -to- $C_{36}$  corynomycolates that contain two  $C_{16}$ -to- $C_{18}$  chains, are comparable in size to GPL, they largely differ in their structure and by their head group. In consequence, changes in the balance between MA and GPL could modify the packing of the lipids and the surface charge

of the membrane and thus influence not only the fluidity but also the permeability of the outer membrane. We showed in the present study that the NCgl2775 protein participates in the outer membrane restructuring caused by heat exposure. Indeed, when the NCgl2775 protein was inactivated, we observed a loss of regulation of the MA and GPL contents induced by heat exposure. However, this loss of regulation is partial, suggesting that the NCgl2775 protein is not the only actor involved in this regulation. Importantly, NCgl2775 overexpression provokes both an increase in the MA contents and a decrease in the FA contents independently of any thermal challenge, confirming that an increase in NCgl2775 concentration alone is able to induce lipid content modifications.

It is clear from our results that the NCgl2775 protein is membrane anchored. Various computer programs predict only one putative membrane-spanning helix overlapping a potential signal sequence but do not detect any lipid posttranslational-modification motif. It is thus likely that the N-terminal hydrophobic segment is not processed and serves as an anchor for the NCgl2775 protein in the plasma membrane, leaving a very short N-terminal extension in the cytosol and the rest of the protein in the periplasmic space. However, further experimental validation is required to confirm these topology predictions. Taken together, our data lead us to propose the following scheme. (i) NCgl2775 activity is localized in or near the plasma membrane and depends on protein concentration. This concentration is increased by heat stress conditions, resulting in the activation of the NCgl2775 protein. (ii) When active, the NCgl2775 protein allows an increase in MA synthesis, concomitant with a decrease in GPL. The precise activity of the NCgl2775 protein is unknown, but the enzyme possesses comparable esterase and thioesterase activities *in vitro*. (iii) These changes, together with a modification of the saturated/unsaturated balance of the MA, lead to a dramatic outer membrane remodeling that protects the outer membrane and, consequently, the bacteria from heat damage. Although it is clear from our data that the NCgl2775 protein enhanced MA biosynthesis, the mechanism by which the protein acts remains elusive. One hypothesis is a direct control of the MA flux by the NCgl2775 protein via an interaction with an enzyme of the MA biosynthetic machinery. This would require an effective interaction only when NCgl2775 is activated (heat stress conditions) and would result in an acceleration of the release of the MA from the enzyme, increasing the global rate of MA synthesis, which in turn would influence GPL synthesis. Such an interaction has been suggested by Parker et al., who proposed that the Rv3802 protein could function as an additional thioesterase for Pks13 (32), the enzyme that catalyzes the condensation of two FA to give MA (32, 35). It is noteworthy that a Pks13/NCgl2775 interaction is not consistent with the predicted topological model of NCgl2775, since the active domain of the protein is predicted to be in the periplasm, while Pks13 is believed to be located on the cytosolic side. Mature MA, obtained from the reduction of the  $\beta$ -ketoester product of Pks13 by CmrA (20), are believed to be translocated across the plasma membrane by an unknown mechanism before being attached to trehalose and transferred onto arabinogalactan. It is thus conceivable from this scheme that the NCgl2775 protein could control the translocation step or interact with a cell wall mycolyltransferase. Alternatively, and based on the demon-

strated phospholipase activity of Rv3802 (32), it is conceivable that when activated, the NCgl2775 protein would hydrolyze a GPL in the plasma membrane, which in turn could serve as a signal for outer membrane restructuring. Though our results do not allow discrimination between the aforementioned hypotheses, it is obvious that NCgl2775 is part of a large regulation process that involves other proteins. Two mycolyltransferase-encoding genes are found upregulated during a heat stress: *mytA*, which is cotranscribed with the NCgl2775 gene, and *mytB* (our unpublished results). An increase in MytA and MytB activities is quite consistent with an increase in MA synthesis, since these two proteins contribute to the transfer of MA onto their final acceptors. The search for other partners is under way.

NCgl2775 is part of an ortholog family exclusively found in all *Corynebacterineae*. Conservation of locus synteny and of protein sequences strongly suggests that the function of all this protein family is also well conserved and specific to this suborder. Indeed, we showed in the present study that overexpression of the MSMEG\_6394 protein in *C. glutamicum* is able to modify the MA/GPL ratio in the same way as its NCgl2775 ortholog does. However, the stress conditions that trigger lipid modifications induced by this protein family could be different from one bacterium to another. Indeed, Miltner et al. found the *Mycobacterium avium* Rv3802c ortholog to be probably involved in bacterial invasion of the intestinal epithelium and showed that its expression is increased under both high-osmolarity and low-oxygen conditions, conditions that mimic the intestinal environment (28). We thus proposed that this protein family plays a role in the regulation of outer membrane lipid composition by influencing the balance between MA and other lipids under stress conditions. We therefore propose to name this protein on the envelope lipid-regulating factor (ElrF).

The balance between MA and other lipids could be more or less important for bacterial physiology among the different genera of *Corynebacterineae*. It is well established that mycobacteria are very sensitive to changes in their outer membrane composition (e.g., mycolates) than corynebacteria. This may explain why NCgl2775 is needed only under stress conditions while the *M. smegmatis* ortholog is essential under physiological conditions. Further investigations to provide insight into this regulation process are in progress. Finally, the crucial, though yet unknown, function of Rv3802 in mycobacteria suggests the use of the protein as a putative drug target in the search for new antituberculous drugs, which are urgently needed.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana-Maria Rosca and Christine Grimaldi (IGM, Orsay, France) for their help with the construction of the *Corynebacterium* mutant and Sabine Gavalda, Nawel Slama and Mathieu Leger (IPBS, Toulouse, France) for fruitful discussions.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University Paris-Sud 11, the University of Toulouse (Paul Sabatier, Toulouse III, France), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0363).

#### REFERENCES

1. Baba, T., K. Kaneda, E. Kusunose, M. Kusunose, and I. Yano. 1989. Thermally adaptive changes of mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* **106**:81–86.
2. Barreiro, C., E. Gonzalez-Lavado, M. Patek, and J. F. Martin. 2004. Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *J. Bacteriol.* **186**:4813–4817.

3. Barreiro, C., D. Nakunst, A. T. Huser, H. D. de Paz, J. Kalinowski, and J. F. Martin. 2009. Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**:359–372.
4. Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. L. Sonnhammer. 2002. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**:276–280.
5. Belisle, J. T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**:1420–1422.
6. Bonamy, C., A. Guyonvarch, O. Reyes, F. David, and G. Leblon. 1990. Interspecies electro-transformation in *Corynebacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**:263–269.
7. Carty, S. M., K. R. Sreekumar, and C. R. Raetz. 1999. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12°C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* **274**:9677–9685.
8. Carvalho, C. M., M. R. Aires-Barros, and J. M. Cabral. 1999. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* **66**:17–34.
9. Daffé, M., and P. Draper. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**:131–203.
10. Daffé, M., M. A. Laneelle, C. Asselineau, V. Levy-Febrault, and H. David. 1983. Intérêt taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann. Microbiol.* **134**:241–256.
11. Denich, T. J., L. A. Beaudette, H. Lee, and J. T. Trevors. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods* **52**:149–182.
12. De Sousa-D'Auria, C., R. Kacem, V. Puech, M. Tropis, G. Leblon, C. Housin, and M. Daffe. 2003. New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycolyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:35–44.
13. Dover, L. G., A. M. Cerdano-Tarraga, M. J. Pallen, J. Parkhill, and G. S. Besra. 2004. Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:225–250.
14. Dubnau, E., J. Chan, C. Raynaud, V. P. Mohan, M. A. Laneelle, K. Yu, A. Quemard, I. Smith, and M. Daffe. 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* **36**:630–637.
15. Dusch, N., A. Puhler, and J. Kalinowski. 1999. Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1530–1539.
16. Guilhot, C., I. Otal, I. Van Rompaey, C. Martin, and B. Gicquel. 1994. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *J. Bacteriol.* **176**:535–539.
17. Hazel, J. R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* **57**:19–42.
18. Katsui, N., T. Tsuchido, R. Hiramatsu, S. Fujikawa, M. Takano, and I. Shibasaki. 1982. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **151**:1523–1531.
19. Kremer, L., Y. Guerardel, S. S. Gurucha, C. Loch, and G. S. Besra. 2002. Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* **148**:3145–3154.
20. Lea-Smith, D. J., J. S. Pyke, D. Tull, M. J. McConville, R. L. Coppel, and P. K. Crellin. 2007. The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* **282**:11000–11008.
21. Le Dantec, C., N. Winter, B. Gicquel, V. Vincent, and M. Picardeau. 2001. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. *J. Bacteriol.* **183**:2157–2164.
22. Liu, J., C. E. Barry III, G. S. Besra, and H. Nikaido. 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **271**:29545–29551.
23. Liu, J., E. Y. Rosenberg, and H. Nikaido. 1995. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11254–11258.
24. Los, D. A., and N. Murata. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**:142–157.
25. Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, D. Albanesi, and D. de Mendoza. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**:6681–6688.
26. Mansilla, M. C., and D. de Mendoza. 2005. The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch. Microbiol.* **183**:229–235.
27. Merkamm, M., and A. Guyonvarch. 2001. Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. *J. Bacteriol.* **183**:1284–1295.
28. Miltner, E., K. Daroogheh, P. K. Mehta, S. L. Cirillo, J. D. Cirillo, and L. E. Bermudez. 2005. Identification of *Mycobacterium avium* genes that affect invasion of the intestinal epithelium. *Infect. Immun.* **73**:4214–4221.
29. Minnikin, D. 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles, vol. 1. Academic Press, London, England.
30. Muffler, A., S. Bettermann, M. Haushalter, A. Horlein, U. Neveling, M. Schramm, and O. Sorgenfrei. 2002. Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J. Biotechnol.* **98**:255–268.
31. Özcan, N., C. S. Ejsing, A. Shevchenko, A. Lipski, S. Morbach, and R. Kramer. 2007. Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **189**:7485–7496.
32. Parker, S. K., R. M. Barkley, J. G. Rino, and M. L. Vasil. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3802c encodes a phospholipase/thioesterase and is inhibited by the antimycobacterial agent tetrahydrolipistatin. *PLoS ONE* **4**:e4281.
33. Patel, B. K., D. K. Banerjee, and P. D. Butcher. 1991. Characterization of the heat shock response in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **173**:7982–7987.
34. Peyret, J. L., N. Bayan, G. Joliff, T. Gulik-Krzywicki, L. Mathieu, E. Schechter, and G. Leblon. 1993. Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **9**:97–109.
35. Portevin, D., C. De Sousa-D'Auria, C. Houssin, C. Grimaldi, M. Chami, M. Daffe, and C. Guilhot. 2004. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:314–319.
36. Portevin, D., C. de Sousa-D'Auria, H. Montrozier, C. Houssin, A. Stella, M. A. Laneelle, F. Bardou, C. Guilhot, and M. Daffe. 2005. The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* **280**:8862–8874.
37. Puech, V., M. Chami, A. Lemassu, M. A. Laneelle, B. Schiffer, P. Gounon, N. Bayan, R. Benz, and M. Daffe. 2001. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**:1365–1382.
38. Riley, L. W. 2006. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J. Clin. Investig.* **116**:1475–1478.
39. Rottem, S., O. Markowitz, and S. Razin. 1978. Thermal regulation of the fatty acid composition of lipopolysaccharides and phospholipids of *Proteus mirabilis*. *Eur. J. Biochem.* **85**:445–450.
40. Sassetti, C. M., D. H. Boyd, and E. J. Rubin. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**:77–84.
41. Shigapova, N., Z. Torok, G. Balogh, P. Goloubinoff, L. Vigh, and I. Horvath. 2005. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**:1216–1223.
42. Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:522–525.
43. Soual-Hoebeke, E., C. de Sousa-D'Auria, M. Chami, M. F. Baucher, A. Guyonvarch, N. Bayan, K. Salim, and G. Leblon. 1999. S-layer protein production by *Corynebacterium* strains is dependent on the carbon source. *Microbiology* **145**:3399–3408.
44. Stewart, G. R., L. Wernisch, R. Stabler, J. A. Mangan, J. Hinds, K. G. Laing, D. B. Young, and P. D. Butcher. 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**:3129–3138.
45. Suutari, M., and S. Laakso. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:285–328.
46. Takayama, K., C. Wang, and G. S. Besra. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:81–101.
47. Toriyama, S., I. Yano, M. Masui, E. Kusunose, M. Kusunose, and N. Aki-mori. 1980. Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria. I. Temperature-induced changes in mycolic acid molecular species and related compounds in *Mycobacterium phlei*. *J. Biochem.* **88**:211–221.
48. Tsuchido, T., N. Katsui, A. Takeuchi, M. Takano, and I. Shibasaki. 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:298–303.
49. West, N. P., F. M. Chow, E. J. Randall, J. Wu, J. Chen, J. M. Ribeiro, and W. J. Britton. 2009. Cutinase-like proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of their variable enzymatic functions and active site identification. *FASEB J.* **23**:1694–1704.
50. Zuber, B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths, and M. Daffe. 2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* **190**:5672–5680.



## Chapitre XI Matériel et Méthodes

Souches utilisées	Caractéristiques	Source ou référence
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Souche sauvage de référence	(Kalinowski <i>et al</i> , 2003)
<i>C. glutamicum</i> Res167	Mutant de restriction de la souche ATCC13032	Collection du Laboratoire
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ PorA-PorH	Res167, PorA <sup>-</sup> , PorH <sup>-</sup>	R. Benz
<i>C. glutamicum</i> CGL2059	Res167, cmytC <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup>	Ce travail
<i>C. glutamicum</i> CGL2060	Res167, cg2875 <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup>	Ce travail
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ pks13::km	Res167, pks13 <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup>	Collection du Laboratoire
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ fadD32::km	Res167, fadD32 <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup>	Collection du Laboratoire
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ accD4::km	Res167, accD4 <sup>-</sup> , Km <sup>R</sup>	Collection du Laboratoire
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ otsA $\Delta$ treY $\Delta$ treS	Res167, otsA <sup>-</sup> , treY <sup>-</sup> , treS <sup>-</sup>	Collection du Laboratoire
<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	Souche sauvage de référence	DSMZ
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Cr8(-) Tox <sup>-</sup>	Souche sauvage de référence	Collection du Laboratoire
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	Souche sauvage de référence	NITE Biological Resource Center
<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	Souche sauvage de référence	Medical Mycology Research Center
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM43247	Souche sauvage de référence	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 dlacZ $\Delta$ M15/ $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), phoA, supE44, $\lambda$ -, thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen

**Tableau 11 :** Caractéristiques principales des génomes des souches utilisées

## XI.1 Souches bactériennes

Tableau 11

### XI.1.1 Souches corynebactériennes

#### XI.1.1.1 Conditions et milieux de culture

Les souches de corynébactéries (sauf la souche *C. glutamicum*  $\Delta$ otsA $\Delta$ treY $\Delta$ treS) sont cultivées dans un milieu liquide BHI (Brain Heart Infusion, Difco) à la concentration de 37 g/L sous agitation à 250 rpm à 30°C, ou sur milieu solide BHI (37 g/L) + agar à 15 g/L à 30°C auxquels peuvent être ajoutés de la kanamycine (Km) à 25 µg/mL ou du chloramphénicol (Cm) à 15 µg/mL.

#### XI.1.1.2 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 et Res167

Il s'agit de la souche de référence pour *Corynebacterium glutamicum*. Son génome a été séquencé pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2003 (Kalinowski *et al*, 2003). Son génome consiste en un seul chromosome circulaire de 3,28 Mpb comprenant 3138 gènes (appelés cgxxxx) et codant pour 3057 protéines.

Une deuxième séquence du génome est disponible de taille comparable (Ikeda & Nakagawa, 2003). Dans ce génome, les gènes sont appelés Ncglxxxx.

La souche utilisée dans ce travail est la souche *C. glutamicum* Res167 dérivée de la souche de référence (Tauch *et al*, 2002).

#### XI.1.1.3 *C. glutamicum* $\Delta$ porA-porH

Cette souche est dérivée de la souche *C. glutamicum* Res167 par délétion de l'opéron codant pour les protéines PorA et PorH (Costa-Riu *et al*, 2003a).

L'étude des mutants ponctuels de PorA et PorH s'effectue après complémentation de la souche  $\Delta$ porA-porH par un plasmide pCGL482 codant pour les protéines :

- PorA mutée sur la sérine 15 en valine et PorH native ( $\Delta$ porA-porH::S15VporA-porH)
- PorH mutée au niveau des sérines ou des thréonines en alanine et PorA native ( $\Delta$ porA-porH::porA-S/TxxAporH)

- PorH mutée au niveau des sérines ou des thréonines en alanine et PorA mutée sur la sérine 15 en valine ( $\Delta porA-porH::S15VporA-S/TxxAporH$ )

L'ensemble de ces souches sont résistantes au chloramphénicol.

#### ***XI.1.1.4 C. glutamicum $\Delta pks13::km, \Delta fadD32::km, \Delta accD4::km$***

Ces souches sont dérivées de la souche *C. glutamicum* Res167 par délétion de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides mycoliques et qui se caractérisent par l'absence d'acides corynomycoliques et donc de mycomembrane. Ces souches ont un phénotype particulier, sur boîte, les colonies présentent un aspect rugueux, et en culture liquide, des agrégats sont observés.

*C. glutamicum  $\Delta pks13::km$*  est la souche mutée au niveau de l'enzyme responsable de la condensation des deux acides gras activés formant l'acide corynomycolique (Portevin *et al*, 2004).

*C. glutamicum  $\Delta fadD32::km$*  est la souche mutée au niveau de l'acyl-AMP ligase permettant d'activer un des deux acides gras sous forme d'acyl-AMP afin qu'il soit pris en charge par Pks13 (Portevin *et al*, 2005).

*C. glutamicum  $\Delta accD4::km$*  est dépourvu d'une acyl-CoA carboxylase nécessaire à la formation de l'acyl-carboxy-CoA correspondant au deuxième acide gras activé pris en charge par Pks13 (Portevin *et al*, 2005).

#### ***XI.1.1.5 C. glutamicum $\Delta otsA \Delta treY \Delta treS$***

La souche  $\Delta otsA \Delta treY \Delta treS$  est une souche dont les 3 voies de biosynthèse du tréhalose sont mutées. Elle se caractérise par l'absence d'acides corynomycoliques en milieu synthétique + saccharose. De même que pour les mutants  $\Delta pks13::km, \Delta fadD32::km, \Delta accD4::km$ , elle présente un aspect rugueux sur boîte et s'agrège en milieu liquide. Par contre, la synthèse d'acides corynomycoliques peut être réinitiée en la cultivant sur milieu synthétique + saccharose + tréhalose et ceci permet donc de restaurer un phénotype sauvage (Tropis *et al*, 2005b).

La souche  $\Delta otsA\Delta treY\Delta treS$  est cultivée en milieu synthétique CGXII à 30°C avec une agitation de 250 rpm (Keilhauer *et al*, 1993) auquel est ajouté une source de carbone à une concentration de 4% (Tableau 12) (Tropis *et al*, 2005b).

Source de carbone	Croissance	Biosynthèse d'acides mycoliques
Saccharose	Oui	Non
Tréhalose	Non	Non
Saccharose + Tréhalose	Oui	Oui

**Tableau 12 :** Croissance et biosynthèse d'acides mycoliques pour la souche *C. glutamicum*  $\Delta otsA\Delta treY\Delta treS$  cultivée sur différentes sources de carbone.

#### ***XI.1.1.6 Corynebacterium efficiens YS-314***

*C. efficiens* est une souche proche de *C. glutamicum*. Elle est très utilisée aussi dans l'industrie pour la production de glutamate. *C. efficiens* a la capacité de croître et de produire du glutamate au-delà de 40°C, contrairement à *C. glutamicum* qui est incapable de croître et produire du glutamate à 40°C et au-delà.

Son génome a été séquencé en 2003 et consiste en un chromosome circulaire de 3,1 Mpb comprenant 3008 gènes (noté cexxxx) dont 2938 codant des protéines (Nishio *et al*, 2003).

#### ***XI.1.1.7 Corynebacterium diphtheriae C8<sub>r</sub> (-) Tox - ATCC 11913***

Un seul génome de *C. diphtheriae* a été séquencé à ce jour : la souche NCTC13129 (Cerdeno-Tarraga *et al*, 2003). Il s'agit d'une souche pathogène responsable de la diphtérie. Cette maladie est causée par la présence d'un bactériophage produisant une exotoxine : la toxine diphtérique.

Au sein du laboratoire, nous possédons une souche de *C. diphtheriae* non pathogène du fait de l'absence du bactériophage codant pour la toxine diphtérique appelée *C. diphtheriae* C8<sub>r</sub> (-) Tox – ou *C. diphtheriae* ATCC 11913 (Barksdale, 1959). Le génome n'est pas connu pour cette souche.

## **XI.1.2 Autres souches bactériennes**

### ***XI.1.2.1 Rhodococcus erythropolis PR4***

Il s'agit d'une bactérie non pathogène découverte dans l'océan pacifique. Cette souche a la caractéristique de dégrader les alcanes en les utilisant comme source de carbone et d'énergie. Son génome consiste en un chromosome circulaire de 6,5 Mpb comprenant 6104 gènes dont 6030 ORFs (Sekine *et al*, 2006).

*Rhodococcus erythropolis* PR4 est cultivée dans un milieu liquide LB (Luria Broth base, Difco) à la concentration de 20 g/L sous agitation à 190 rpm, ou sur milieu solide LB + agar à 15 g/L à 30°C pendant 2 à 3 jours.

### ***XI.1.2.2 Nocardia farcinica IFM10152***

Il s'agit d'une souche pathogène de type 2, isolée de poumons d'un homme de 68 ans. Son génome consiste en un chromosome circulaire de 6 Mpb comprenant 5747 gènes dont 5683 ORFs (Ishikawa *et al*, 2004).

La souche *Nocardia farcinica* IFM10152 est cultivée sur milieu liquide LB (Luria Broth base, Difco) à la concentration de 20 g/L sous agitation à 190 rpm, ou sur milieu solide LB + agar à 15 g/L à 30°C pendant 2 à 3 jours.

### ***XI.1.2.3 Gordonia bronchialis DSM 43247***

Il s'agit d'une souche pathogène de type 2, isolée de crachat d'une femme ayant une maladie pulmonaire.

Son génome consiste en un chromosome circulaire de 5.2Mpb comprenant 4922 gènes dont 4616 ORFs.

La souche *Gordonia bronchialis* DSM 43247 est cultivée sur milieu liquide LB (Luria Broth base, Difco) à la concentration de 20 g/L sous agitation à 190 rpm ou sur milieu solide LB + agar à 15 g/L à 30°C pendant 2 à 3 jours.

### ***XI.1.2.4 Bacillus subtilis ATCC 23857***

La souche *B. subtilis* ATCC 23857 est utilisée dans cette étude comme bactérie témoin des bactéries de type Gram<sup>+</sup>. Cette souche est cultivée sur milieu liquide riche LB (Luria Broth

base, Difco) à la concentration de 20 g/L sous agitation à 190 rpm, ou sur milieu solide LB + agar à 15 g/L à 37°C pendant une nuit.

### XI.1.2.5 *Escherichia coli* DH5α

La souche *E. coli* DH5α est cultivée sur milieu liquide riche LB (Luria Broth base, Difco) à la concentration de 20 g/L sous agitation à 190 rpm à 37°C, ou sur milieu solide LB + agar à 15 g/L à 37°C pendant une nuit.

## XI.2 Biologie Moléculaire

Plasmides	Caractéristiques	Source
pMCS5	Plasmide navette avec une origine de réplication chez <i>E. coli</i> et non répliatif chez <i>C. glutamicum</i> Amp <sup>R</sup> , f1 ori, lacZ', pBR322 ori, T7 promoter, polylinker: from pUC18, MCS inserted.	MoBiTec
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , f1 ori, lacZ <sup>α</sup> , pUC ori, T7 promoter, MCS inserted, M13 reverse priming site, M13 forward (-20) priming site, M13 forward (-40) priming site	Invitrogen
pCGL482	Plasmide navette avec une origine de réplication chez <i>E. coli</i> et <i>C. glutamicum</i> , Cm <sup>R</sup>	Wojcik, ORSAN
pEH1	Plasmide d'interruption du gène <i>cg0413</i> avec le gène <i>aphIII</i> , Km <sup>R</sup> dérivé de pMCS5	Ce travail
pEH2	Plasmide de délétion du gène <i>cg2875</i> avec le gène <i>aphIII</i> , Km <sup>R</sup> dérivé de pMCS5	Ce travail
pMC5	Plasmide pCGL482 avec une copie du gène <i>cg0413</i> avec une étiquette histidine en C-terminal et la glycine en position 339 substituée par un acide aspartique, Cm <sup>R</sup>	N. Bayan
pMC6	Plasmide pCGL482 avec une copie du gène <i>cg0413</i> , Cm <sup>R</sup>	N. Bayan

**Tableau 13** : Liste des plasmides utilisés au cours de ce travail

### XI.2.1 Purification de l'ADN génomique de *C. glutamicum* Res167

2mL de culture de *C. glutamicum* Res167 en phase stationnaire sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de tampon TEG (25 mM de Tris-HCl pH = 8.5, 10 mM d'EDTA, 1% de glucose) contenant du lysozyme à 20 mg/mL. Le mélange est incubé de 1 à 2 heures à 37°C puis centrifugé 1 minute à 3000 g. Le culot est repris dans 100 µL de tampon TEG. A ce mélange sont ajoutés 500 µL d'une solution TE (25

mM de Tri-HCl pH=8.5, 10 mM d'EDTA à pH=8.5) contenant 0.5% de SDS et 1 mg/mL de protéinase K. Le tout est incubé 1 heure à 37°C, puis 100 µL de NaCl à 5 M sont ajoutés délicatement. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 80 µL d'une solution de CTAB-NaCl sont ajoutés puis le mélange est incubé à 65°C pendant 20 minutes. Deux extractions sont ensuite effectuées avec une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1). A chaque ajout de la solution phénolique, le mélange est vortexé puis centrifugé à 13000 rpm pendant 15 minutes. La phase supérieure est récupérée puis précipitée par 2 volumes d'éthanol froid pendant une nuit. La solution est alors centrifugée à 4°C pendant 10 minutes puis lavée avec de l'éthanol 70% et stockée 5 minutes à -20°C. Après centrifugation à 4°C pendant 5 minutes, le culot est séché et repris dans 100 µL d'une solution eau + RNase à 10 mg/mL puis incubé à 37°C pendant 1 heure.

### **XI.2.2 Préparation des bactéries électrocompétentes**

*C. glutamicum* Res167 et la souche CGL2059 sont cultivées sur milieu BHI jusqu'à  $DO_{600nm} = 1,5$  et *E. coli* DH5α est cultivée sur milieu LB jusqu'à obtenir une  $DO_{600nm} = 0.5$ . La croissance est stoppée en plaçant la culture dans la glace pendant 20 minutes. Toutes les étapes suivantes sont effectuées à 4°C. La culture est centrifugée pendant 10 minutes à 3000 g. Le culot bactérien est ensuite lavé deux fois à l'eau distillée puis une fois avec du glycérol 10%. Le culot est ensuite repris au  $1/100^{\text{ème}}$  du volume initial pour les corynébactéries et au  $1/500^{\text{ème}}$  du volume initial pour *E. coli* par du glycérol 10%. Les bactéries sont alors prêtes pour la transformation et peuvent être stockées à -80°C.

### **XI.2.3 Transformation des bactéries par électroporation**

L'électroporation est une technique de transformation des bactéries par un choc électrique qui va générer des pores au niveau des membranes permettant l'entrée de l'ADN.

100 µL de bactéries compétentes sont électrotransformées par 100 ng à 1 µg d'ADN plasmidique. L'électroporation se fait grâce à un électroporateur « BioRad » dans les conditions suivantes : 200 Ω, 2,5 kV et 25 µF. Le mélange ADN-bactéries est placé immédiatement dans 900 µL de milieu BHI pour les deux souches de *C. glutamicum* puis incubé à 30°C pendant 2 heures et dans le milieu LB pendant 1 heure à 37°C pour *E. coli*. La culture est centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes puis le culot est repris dans 200 µL de BHI ou de LB. Les cellules sont alors étalées sur milieu sélectif solide.

#### **XI.2.4 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les différentes étapes de construction des différents mutants sont contrôlés par analyse des fragments d'ADN sur gel d'agarose 0.7% dans du tampon TAE 1X contenant 0,5µg/mL de BET.

#### **XI.2.5 Construction du mutant de délétion $\Delta cg2875::km$**

Le mutant de délétion s'effectue par double recombinaison homologue au niveau d'une séquence en amont (AM) et aval (AV) de la séquence codante du gène *cg2875*. La séquence codante va être alors remplacée par le gène *aphIII* (gène conférant la résistance à la kanamycine).

Ce travail a été effectué sous la direction de Christine Houssin (IGM, Université Paris-Sud11-Orsay)

##### ***XI.2.5.1 Construction du plasmide de délétion pEH2***

Les séquences AM et AV ainsi que le gène de résistance à la kanamycine sont clonés dans le plasmide pMCS5 (Tableau 13).

##### ***XI.2.5.1.1 Amplification des séquences amont (AM), aval (AV) et du gène aphIII***

L'amplification des séquences AM et AV grâce à deux couple d'amorces (fragment amont : Del1-2 et fragment aval Del3-4) portant chacun un site de restriction (Tableau 14). L'amplification du gène *aphIII* se fait à partir d'un plasmide déjà existant contenant le gène de résistance (pMCS5  $\Delta sfp$ ) grâce à deux amorces s'hybridant en amont et aval du gène sur le plasmide pMCS5 (pMCS5 1 et pMCS5 2 ; Tableau 14).



<b>Del1</b>	5'-TAT CTG GAT CCA GGA CCT TAT CC-3' BamHI
<b>Del2</b>	5'-AAT ACC GCG GTG TGA TCT CTC TTT C-3' SacII
<b>Del3</b>	5'-TTA TCC GCG GTC GCG ATC CTT C-3' SacII
<b>Del4</b>	5'-GGG AAG CTT CTT GCA CAC CAT TG-3' HindIII
<b>Ver1</b>	5'-AAA TGG CCC AGT TTT TGA CG-3'
<b>Ver2</b>	5'-TGG TCA GTG TCC GTC TCA AG-3'
<b>pMCS5 1</b>	5'-AGTGCCAAGCTAATTACCCTG-3'
<b>pMCS5 2</b>	5'-AGGAAACAGCTATGACCATG-3'

**Tableau 14 :** Amorces utilisées pour l'amplification des séquences AM, AV et le gène *aphIII*

L'amplification est effectuée par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant l'appareil Applied Biosystem (2720 thermal cycler) selon les cycles résumés dans le Tableau 15

Fragments	Dénaturation	Cycles (30)			Elongation	Enzyme
		Dénaturation	Hybridation	Elongation		
AM et AV	95°C, 3 minutes	95°C, 1 minute	52°C, 30 secondes	72°C, 1 minute	72°C, 10 minutes	GoTaq (promega) 5 u/μL
<i>aphIII</i>	98°C, 1 minute	98°C, 10 secondes	52°C, 20 secondes	72°C, 3 minutes	72°C, 7 minutes	Phusion (Finnzymes) 2 u/μL

**Tableau 15 :** Cycles PCR et enzymes utilisés pour l'amplification des séquences AM, AV et le gène *aphIII*

Le mélange réactionnel (50 μL) est constitué de l'enzyme (0,2 μL ; Tableau 15), d'ADN génomique de *C. glutamicum* Res167, de MgCl<sub>2</sub> 2 mM, d'un mélange de dNTP (0,2 mM chaque), des amorces (0,5 μM) dans le tampon préconisé par le fabricant.

Les fragments amplifiés sont ensuite purifiés grâce au kit « High pure PCR product purification » de Roche.

#### XI.2.5.1.2 Digestion et ligation des différents fragments

Le plasmide pMCS5 et les fragments amplifiés sont digérés par les enzymes de restriction appropriées.

La digestion se fait pour chaque enzyme dans le tampon compatible à 37°C pendant une nuit. Les fragments digérés sont ensuite purifiés par le kit « High pure PCR product purification » de Roche

	Cg2875	
pMCS5	BamHI	HindIII
<i>aphIII</i>	SacII	SacII
AM	BamHI	SacII
AV	SacII	HindIII

**Tableau 16 :** Digestion des fragments de PCR et du plasmide par les enzymes de restriction

La ligation s'effectue grâce à la T4 DNA ligase (Fermentas) dans son tampon spécifique en présence d'ATP, des trois fragments de PCR et du plasmide digérés. Le mélange est incubé à température ambiante pendant une nuit.

#### ***XI.2.5.2 Transformation et sélection des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$ transformées***

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer *E. coli* DH5 $\alpha$  par électroporation puis les bactéries sont étalées sur boîtes de LB-agar en présence de kanamycine (25  $\mu$ g/mL) et de X-Gal (2 mg) nécessaire à la sélection. Des clones de couleur blanche sont analysés pour leur contenu en ADN plasmidique. Pour cela, les plasmides sont purifiés à partir de culture de ces clones grâce au kit « Wizard plus Minipreps DNA purification system » de Promega. Les plasmides sont ensuite vérifiés par séquençage.

#### ***XI.2.5.3 Transformation et sélection des bactéries *C. glutamicum* ATCC13032 transformées***

Les plasmides pMCS5 $\Delta$ cg2875 purifiés à l'étape précédente sont utilisés pour l'électrotransformation des bactéries *C. glutamicum* Res167. Plusieurs transformations sont effectuées avec des quantités d'ADN variant de 1 à 10  $\mu$ g. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de BHI-agar en présence de 25  $\mu$ g/mL de kanamycine. Plusieurs clones sont

sélectionnés et analysés par PCR grâce aux amorces de vérification Ver1 et Ver2 (Tableau 14) afin de sélectionner ceux ayant effectué les deux événements de recombinaison homologue. Les fragments de PCR ayant la taille attendue sont séquencés pour vérifier que l'échange allélique s'est correctement effectué. Les protéines des clones dont le gène a bien été délété (souche CGL2060 ou *cg2875::km*) sont par la suite analysées en MALDI-TOF.

### **XI.2.6 Construction du mutant d'interruption *cmytC***

Le mutant d'interruption s'effectue par simple recombinaison homologue à l'intérieur de la séquence codante du gène *cg0413*. Ceci va permettre d'interrompre la phase de lecture par insertion d'un plasmide contenant le gène *aphIII*.

Ce travail a été effectué sous la direction de Christine Houssin (IGM, Université Paris-Sud11-Orsay)

#### ***XI.2.6.1 Construction du plasmide d'interruption du gène *cg0413* (pEH1)***

La partie de l'ORF du gène *cg0413* permettant la recombinaison est clonée dans un vecteur commercial pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen).

##### *XI.2.6.1.1 Amplification d'une partie de la séquence codante de *Cg0413**

L'amplification du fragment de *cg0413* se fait grâce à un couple d'amorces 1 et 2 (Tableau 17).

	<i>Cg0413</i>
<b>1</b>	5'-AAT TGC GAT GTC CAC CAT TG-3'
<b>2</b>	5'-TAC CCA GTC GGT GTA GTA GG-3'
<b>Del-1</b>	5'-TTA TCT CGA GCG CTG AAT AGG TC-3'
<b>Del-4</b>	5'-ACG GAG ATC TAA AAT ACG GTC G-3'
<b>F-20</b>	5'-CTG GCC GTC GTT TTA C-3'
<b>Rev</b>	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

**Tableau 17 :** Amorces utilisées pour la construction du mutant d'interruption *cMytC*

L'amplification est effectuée par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant l'appareil Applied Biosystem (2720 thermal cycler) selon le cycle suivant :

- Dénaturation à 95°C pendant 3 minutes
- 30 cycles de Dénaturation (95°C, 1 minute) – Hybridation (52°C, 30 secondes) – Elongation (72°C, 1 minute)
- Elongation à 72°C pendant 10 minutes

Le mélange réactionnel de 50 µL est constitué de l'enzyme GoTaq (0,2µL à 5 u/µL de Promega) d'ADN génomique de *C. glutamicum* Res167, de MgCl<sub>2</sub> 2 mM, d'un mélange de dNTP (0,2 mM chaque), des amorces (0,5 µM) dans le tampon préconisé par le fabricant.

Les fragments amplifiés sont ensuite purifiés grâce au kit « High pure PCR product purification » de Roche.

#### XI.2.6.1.2 Ligation du fragment de cg0413 dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>

Le clonage de l'insert amplifié dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> se fait par l'intermédiaire du kit « TOPO TA cloning version 2 » d'Invitrogen fourni avec le plasmide.

#### **XI.2.6.2 Transformation et sélection des bactéries *E. coli* DH5α transformées**

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer *E. coli* DH5α par électroporation puis les bactéries sont étalées sur boîtes de LB-agar en présence de kanamycine (25 µg/mL) et de X-Gal (2 mg) nécessaire à la sélection. Des clones de couleur blanche sont analysés pour leur contenu en ADN plasmidique. Pour cela, les plasmides (pEH1 ou TOPOmytC::km) sont purifiés à partir de culture de ces clones grâce au kit « Wizard plus Minipreps DNA purification system » de Promega, puis après analyse par différentes enzymes de restriction, vérifiés par séquençage.

#### **XI.2.6.3 Transformation et sélection des bactéries *C. glutamicum* Res167 transformées**

Le plasmide pEH1 est utilisé pour l'électrotransformation des bactéries *C. glutamicum* Res167. Plusieurs transformations sont effectuées avec des quantités d'ADN variant de 1 à 10 µg. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de BHI-agar en présence de 25 µg/mL de kanamycine. Des clones sont sélectionnés et analysés par PCR grâce aux amorces de

vérification Del1, Del4, F-20 et Rev (Tableau 17) afin de sélectionner ceux ayant effectués la recombinaison homologe. Les fragments de PCR ayant la taille attendue sont séquencés pour vérifier que l'interruption s'est correctement effectuée. Les protéines issues des clones ayant le gène d'intérêt interrompu sont par la suite analysées par MALDI-TOF.

#### ***XI.2.6.4 Complémentation du mutant cMytC***

##### ***XI.2.6.4.1 Plasmide de complémentation pMC6***

La construction du plasmide pMC6 contenant le gène codant pour la protéine cMytC a été construit par Roland Bou Raad au cours de sa thèse (Bou Raad, 2010). Le gène *cg0413* est cloné dans un plasmide navette pCGL482 ayant une origine de réplication chez *E. coli* et chez *C. glutamicum* et contenant le gène de résistance au chloramphénicol.

##### ***XI.2.6.4.2 Transformation et sélection des bactéries *C. glutamicum* cMytC complémentées***

Les plasmides fournis par N.Bayan (IBBMC, Université Paris-Sud11-Orsay) sont utilisés pour l'électrotransformation (voir la partie XI.2.3) des souches CGL2059. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de BHI-agar en présence de 25 µg/mL de kanamycine et de 15 µg/mL de chloramphénicol. Les protéines issues des clones positifs sont analysées en MALDI-TOF et par Western-Blot à l'aide d'anticorps anti-cMytC (fourni par C. Houssin).

### **XI.3 Biochimie des protéines**

#### **XI.3.1 Gel SDS-PAGE**

##### ***XI.3.1.1 Protocole de Laemmli***

Le protocole de Laemmli (Laemmli, 1970) a été choisi pour analyser des protéines de masse moléculaire supérieur à 15 kDa. Il s'agit d'une séparation de protéines en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide dont le pourcentage (10%, 12%, 15%) dépend de la taille des protéines étudiées. La solution d'acrylamide/bisacrylamide utilisée est dans un rapport 37,5/1. La migration s'effectue dans un tampon Tris-glycine. La coloration du gel s'effectue soit par le bleu de Coomassie soit par le nitrate d'argent si la quantité de protéines est trop faible.

### ***XI.3.1.2 Protocole de Schagger***

Le protocole de Schagger (Schagger & von Jagow, 1987; Schagger, 2006) a été choisi pour analyser des protéines de masse moléculaire inférieur à 15kDa. Il s’agit d’une séparation de protéines en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide 16%. La solution d’acrylamide/bisacrylamide utilisée (19/1) permet d’avoir un maillage plus serré afin d’avoir une meilleure résolution au niveau des protéines de faibles masses. La migration s’effectue dans un tampon Tris-Tricine. La coloration du gel s’effectue soit par le bleu de Coomassie soit par le nitrate d’argent si la quantité de protéines est trop faible.

### **XI.3.2 Western-blot**

Après migration des protéines sur gel d’électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, en système semi-sec (TRANSBLOT SD SEMI DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD). Le tampon de transfert, tampon Towbin, est composé de Tris-HCl 25 mM pH 8,3, de glycine 192 mM et de 20% de méthanol. Après transfert, les sites réactifs de la membrane sont bloqués par du tampon de blocage (Tris Buffer Saline, TBS : 25 mM Tris-base, 140mM NaCl, 2,7mM de KCl à pH 7,4) contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre pendant 1 heure à 4C sous agitation douce. La membrane est ensuite incubée avec des anticorps primaires (anticorps anti-PorA, anti-PorB ou anti-cMytC) dilués dans le tampon de blocage, à 4C pendant une nuit. Les membranes sont lavées trois fois pendant 10 min avec du TBS contenant 0,5% de Tween 20. Puis elles sont incubées avec des anticorps secondaires anti-IgG de l’espèce dans laquelle a été produit les anticorps primaires couplés à la phosphatase alcaline. Les membranes sont à nouveau lavées avec du TBS + Tween 20. La révélation des protéines se fait en ajoutant les réactifs Nitro Blue Tetrazolium (NBT) et 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) dans le tampon de révélation (Tampon Tris-base 100 mM, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,5). La révélation est arrêtée par addition de tampon TBS + EDTA (20 mM).

### **XI.3.3 Purification des protéines par chromatographie échangeuse d’anions**

La colonne utilisée est une colonne échangeuse d’anions forte Poros HQ (Volume de colonne = 1,7 mL ; Pression maximale 4MPa) avec une surface d’ionisation large allant de pH=1 à 14 (POROS<sup></sup> HQ, PerSeptive Biosystems). Cette colonne est utilisée en FPLC (“Fast Protein

Liquid Chromatography») sur l'appareil ÄKTA-FPLC (Amersham, Biosciences), à un débit de 1 mL/min et équipé d'un détecteur UV à 280 nm.

Les essais de purification des protéines PorA, PorH et la protéine X ont été effectués après précipitation de l'extrait CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:2 dans l'éther diéthylique et reprise du précipité dans le tampon A en présence ou non de détergent (10 mM Tris-HCl pH = 8 ± 0,4% LDAO). Avant l'injection de l'extrait protéique, la colonne est équilibrée avec 10 CV de tampon A (10 mM Tris-HCl pH=8 ± 0,4% LDAO). Après injection de l'extrait protéique, le matériel non fixé à la phase est éliminé par 5 CV de tampon A. L'élution des protéines se fait suivant un gradient linéaire de NaCl allant de 20 mM à 1 M sur 30 CV à l'aide du tampon B (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 M NaCl ± 0,4% LDAO). La matrice de la colonne est ensuite lavée par 5 CV de tampon B. Les différentes fractions obtenues sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE et MALDI-TOF.

#### **XI.3.4 Purification par chromatographie d'exclusion en solvant organique**

L'objectif de cet essai était de purifier en solvants organiques les protéines PorA, PorH et la protéine X directement à partir de l'extrait CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:2 suivant leur masse moléculaire. Pour cela, nous avons utilisé une phase de gel filtration compatible avec les solvants organiques : Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Il s'agit de dextrans hydroxypropylés liés entre eux permettant d'avoir un maillage avec une taille limite d'exclusion de 5000Da.

1 g de phase LH-20 a été mis à « gonfler » dans un mélange de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:2 durant 3 heures à température ambiante permettant d'avoir un volume de colonne d'environ 4 mL. La phase est ensuite conditionnée dans une colonne en verre. 100 µL d'échantillon concentré sont déposés sur la colonne et sont élués avec du CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:2 en fractions de 300 µL. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par MALDI-TOF.

#### **XI.3.5 Purification par HPLC**

L'essai de purification des protéines PorA, PorH et la protéine X a été effectué sur une HPLC WATERS 600E équipé d'un détecteur UV Waters 2996 photodiode array detector. La colonne utilisée est une phase inverse C18 analytique (Sphérisorb, 125 x 4.6 mm ; taille des particules 3 µm). 20 µL d'échantillon sont injectés et élués avec un gradient d'acétonitrile/eau de 30% à 100% d'acétonitrile sur 60 minutes suivi d'un palier à 100% acétonitrile pendant 20

minutes avec un débit de 1 mL/min. Les différentes fractions obtenues sont analysées par MALDI-TOF.

## **XI.4 Caractérisation de la modification post-traductionnelle**

### **XI.4.1 Extraction des bactéries par des solvants organiques**

Les différentes souches de *Corynebacterineae* sont cultivées jusqu'à obtenir une DO de 10 à 600 nm puis les cultures sont centrifugées à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont extraits par un mélange chloroforme/méthanol 1:2 dans un rapport de 1 g de culot pour 12 mL de solvant. Cette extraction permet d'obtenir l'ensemble des lipides extractibles (phospholipides, MMT, DMT...) et certaines protéines comme la protéine X, PorA et PorH. Cet extrait peut être directement analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode linéaire positif.

### **XI.4.2 Déacylation alcaline des protéines acylées**

L'extrait protéique est lavé pour éliminer tous les composés contenant des acides mycoliques autre que les protéines. Puis, l'extrait protéique en solution dans le chloroforme/méthanol est précipité dans de l'éther diéthylique en rapport 1:2 (v/v) à 20°C pendant 24 heures minimum. Ce mélange est ensuite centrifugé à 3000 g à 4°C. Le culot est séché puis repris dans 1 mL d'eau acidifiée à pH = 3-4 afin de protoner la fonction acide des éventuels acides mycoliques libres pour pouvoir les extraire par la suite. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois par des solvants organiques afin d'extraire tous les lipides à acides mycoliques : 2 lavages au chloroforme puis 2 lavages à l'éther diéthylique le contenu de chaque phase est analysé par CCM dans les solvants de migration chloroforme/méthanol/eau 65:25:4 (v/v/v) et révélation à l'anthrone pour visualiser le MMT et DMT puis dichlorométhane 100% après méthylation et révélation à la rhodamine B sous UV pour visualiser les acides mycoliques libres.

La phase aqueuse est traitée par une solution de NaOH 0,2 M pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par ajout d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20% jusqu'à l'obtention d'un pH acide. Cette acidification permet aussi de protoner l'acide mycolique libéré afin de l'extraire par des solvants organiques et de l'analyser par les différents méthodes à disposition (CCM, GC, GC-MS et MALDI-TOF)



Une extraction à l'éther diéthylique est effectuée pour séparer les protéines déacylées contenues dans la phase aqueuse des acides mycoliques libérés extraits dans la phase organique.

#### *XI.4.2.1 Analyse de la phase aqueuse*

L'analyse de la phase aqueuse s'effectue par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode linéaire positif. Afin d'obtenir un meilleur signal, l'échantillon est dialysé dans de l'eau pendant une nuit à température ambiante grâce à une membrane de dialyse avec un cut-off de 1000Da.

#### *XI.4.2.2 Analyse de la phase organique*

L'analyse de la phase organique se fait à l'aide de différentes méthodes : la chromatographie en phase gazeuse (GC), la GC couplée avec la spectrométrie de masse à impact électronique (GC-MS) et la spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflectron positif. Pour les études en GC et GC-MS, les acides mycoliques sont méthylés sur la fonction carboxylique et silylés sur la fonction hydroxyle.

La phase organique méthylée est analysée en parallèle par CCM dans un solvant de migration  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100% puis une révélation à la rhodamine B sous UV ou bien, lors de l'expérience de marquage au  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate la plaque de silice est révélée par autoradiographie à l'aide d'un phosphor imager (Typhoon Trio GE healthcare) après exposition de la plaque sur un écran Fujifilm pendant 3 jours.

##### *XI.4.2.2.1 Méthylation des acides mycoliques*

La phase organique est séchée puis 2 mL de diazométhane sont ajoutés. Après 15 minutes à température ambiante, le mélange réactionnel est évaporé sous flux d'air.

##### Préparation du diazométhane :

Dans un erlenmeyer refroidi dans la glace, 1 g de nitrosométhylurée est ajouté séquentiellement à un mélange de KOH 40% (3 mL)/éther diéthylique (15 mL) en agitant doucement à chaque ajout. Après 10 minutes, la phase supérieure étherée est prélevée, en ayant soin d'éviter de prendre de la solution aqueuse, puis transférée dans une deuxième

erlenmeyer refroidi dans la glace contenant des pastilles de KOH. Ce traitement par les pastilles de KOH permet d'éliminer les sous-produits de la réaction solubles dans l'eau et insolubles dans l'éther diéthylique. Après 15 minutes, la solution de diazométhane est prête à l'emploi et doit être conservée à 4°C.

#### XI.4.2.2.2 Triméthylsilylation des acides mycoliques

Les acides mycoliques dérivés sous forme d'esters de méthyle sont traités par 300 µL de pyridine anhydre + 200 µL d'hexaméthylidisilazane + 100 µL de triméthylchlorosilane. Après 10 minutes à température ambiante dans un tube à vis, l'échantillon est séché sous flux d'azote puis repris dans de l'éther de pétrole pour les différentes analyses.

### **XI.5 Marquage au [1-<sup>14</sup>C]-palmitate**

Une culture de 25 mLensemencée à  $DO_{600nm} = 0.1$  est mise en présence de 10 µCi de [1-<sup>14</sup>C]-Palmitate (Perkin Elmer) en début de phase exponentielle. Les cellules sont récupérées soit en phase exponentielle soit en phase stationnaire de croissance par centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les lipides et les protéines PorA, PorH et la protéine X sont extraits dans un mélange de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:2 (v/v) pendant une nuit à température ambiante. L'extrait organique est ensuite analysé soit pour visualiser la libération d'acides mycoliques après déacylation alcaline soit pour la quantification des lipides extractibles par CCM suivie d'une révélation par autoradiographie.

### **XI.6 Analyse quantitative des lipides**

Il est possible de quantifier séparément les acides mycoliques liés au tréhalose (MMT et DMT) et aux protéines (PorA, PorH et protéine X) de ceux liés à l'arabinogalactane. Les premiers sont issus de la fraction extraite par des solvants organiques dite « lipides extractibles » après saponification. Ceux liés à l'arabinogalactane sont obtenus par saponification des bactéries délipidées et sont contenus dans la fraction appelée « lipides liés ».

### **XI.6.1 Quantification des acides mycoliques issus des « lipides extractibles »**

Les lipides extractibles (1g de cellules pour 12 mL de chloroforme/méthanol 1:2) sont extraits du culot bactérien humide par trois extractions successives par des mélanges  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  1/2, 1/1 et 2/1 (v:v). Chacune des extractions est réalisée sur la nuit à température ambiante. La phase organique est récupérée par filtration (filtre préalablement taré) dans un ballon rodé de 500 mL. Les extraits organiques rassemblés sont ensuite séchés à l'évaporateur rotatif puis lavés selon une partition  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  1/1 (v:v) pour éliminer les composés hydrophiles (ex. les polysaccharides). Le mélange est laissé sur la nuit afin d'obtenir la séparation de deux phases. Pour finir, la phase chloroformique est récupérée dans un tube taré, séchée puis pesée et constitue la fraction dite « lipides extractibles ». Afin de quantifier les acides mycoliques contenus dans cette fraction, 100 mg de lipides extractibles sont traités par 2 mL de KOH 7 M /2-methoxyethanol en rapport 1/7 (v:v) pendant trois heures à 110°C. Le mélange réactionnel est acidifié par ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique 20%. Les acides mycoliques sont extraits trois fois par de l'éther diéthylique. La phase étherée est ensuite lavée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre de cette dernière. Ensuite, la phase étherée est concentrée à l'évaporateur rotatif, récupérée dans un tube en verre préalablement taré, puis séchée et pesée. La saponification libère les acides mycoliques et les acides gras. Pour séparer ces deux espèces après méthylation au diazométhane, une purification sur colonne de florisil est effectuée dans un rapport de 1g de matériel à déposer pour 70 g de florisil. Les éluions consistent en un gradient d'éther de pétrole (EP) et d'éther diéthylique (5 éluions : EP 100% ; EP/Et<sub>2</sub>O 95:5 (v/v) ; EP/Et<sub>2</sub>O 90:10 (v/v) ; EP/Et<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) ; Et<sub>2</sub>O 100%). Chaque fraction est récupérée puis pesée. Classiquement les acides gras sont retrouvés dans les fractions 2 et 3 tandis que les acides corynomycoliques dans les fractions 4 et 5 (après vérification par CCM). Le pourcentage d'acides mycoliques libres correspond au rapport des masses des fractions 4 et 5 après vérification par CCM sur la masse totale des fractions.

### **XI.6.2 Quantification des acides mycoliques issus des « lipides liés »**

Les bactéries délipidées, ou résidus bactériens récupérés sur le filtre sont séchés à température ambiante puis pesés.

Cette fraction est appelée « lipides liés » car elle contient les acides mycoliques liés de façon covalente à l'arabinogalactane. Ces derniers sont obtenus par saponification des bactéries délipidées séchées : 1 g de bactéries délipidées est traité par 20 mL de KOH 7M/2-methoxyethanol en rapport 1/7 (v:v) pendant trois heures à 110°C. Le mélange réactionnel est

acidifié par ajout de 6 mL d'acide sulfurique 20%. Les acides mycoliques sont extraits trois fois par 50 mL d'éther diéthylique dans une ampoule à décanter de 250 mL. La phase étherée est ensuite lavée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Si nécessaire, du sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en poudre est rajouté pour éliminer les traces d'eau. Ensuite, la phase étherée est concentrée à l'évaporateur rotatif, récupérée dans un tube en verre préalablement taré, puis séchée et pesée. La saponification libère les acides mycoliques mais aussi quelques acides gras. Les acides mycoliques sont purifiés après méthylation au diazométhane, comme détaillé dans la partie XI.6.1. Le pourcentage d'acides mycoliques liés correspond à la masse des fractions 4 et 5 après vérification par CCM divisé par la masse des bactéries délipidées.

### **XI.6.3 Quantification des lipides extractibles après marquage métabolique au [1- $^{14}\text{C}$ ]-Palmitate**

Les lipides extractibles marqués au [1- $^{14}\text{C}$ ]-Palmitate sont extraits du culot bactérien humide par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  1:2 (v/v) sur la nuit à température ambiante. La phase organique est récupérée par centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C puis séchée sous flux d'air et pesée. Les différentes phases organiques obtenues pour les différentes souches sont analysées par CCM dans le solvant de migration  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 (v/v/v). La couche mince de silice est révélée par autoradiographie à l'aide d'un phosphor imager (Typhoon Trio GE healthcare) après exposition de la plaque sur un écran Fujifilm pendant 3 jours.

La quantification relative du composé d'intérêt est effectuée par mesure de l'intensité de la tâche par rapport à l'intensité totale de la piste en utilisant le logiciel Image Quant (version 5.1, Molecular dynamics).

## **XI.7 Analyse qualitative des « lipides extractibles »**

Les lipides extractibles sont analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice (Silica gel G60, 20 cm x 20 cm sur support en verre) après migration dans un solvant  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 (v/v/v). Ce mélange de migration permet de séparer le DMT, le MMT et les phospholipides (PG, PI et PIMs). Une piste témoin DMT + MMT ainsi que le calcul des  $R_f$  (rapport frontal) permettent d'identifier chaque composé.

Afin de visualiser ces différents composés, une révélation par vaporisation d'anthrone (Fluka AG, Buchs, SG) à 0,2% dans de l'acide sulfurique (85%) et chauffage est effectuée. Les

composés glycosylés sont révélés en bleu et apparaissent en premier lors du chauffage. Les phospholipides apparaissent en jaune après un chauffage poussé. Pour révéler spécifiquement les phospholipides, le réactif de Dittmer à froid est utilisé et donnant une coloration bleu pour les phospholipides (Dittmer & Lester, 1964).

Les lipides extractibles marqué au [1-<sup>14</sup>C]-Palmitate sont analysés par CCM dans différents solvants de migration : CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 65:25:4 (v/v/v) et CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 60:35:8 (v/v/v). La couche mince de silice est révélée par autoradiographie à l'aide d'un phosphor imager (Typhoon Trio GE healthcare) après exposition de la plaque sur un écran Fujifilm pendant 3 jours.

## **XI.8 Spectrométrie de masse**

### **XI.8.1 MALDI-TOF**

1 µL des échantillons est ensuite déposé sur la plaque, mélangé avec 1 µL de matrice et cristallisé à température ambiante.

#### ***XI.8.1.1 Détection en mode linéaire***

Les analyses MALDI-TOF en mode linéaire positif ont été effectuées sur un appareil (MALDI-TOF Voyager DE-STR ; PerSeptive Biosystems) équipé d'un analyseur Time Of Flight. La source d'ionisation Matrix Assisted Laser Desorption est constituée d'un laser à N<sub>2</sub> d'une longueur d'onde de 337 nm. Les ions formés sont accélérés vers l'analyseur à une tension de 25 kV en mode linéaire avec un délai d'extraction de 100ns. 2000 coups sont accumulés en mode ion positif et les données de spectrométrie de masse sont acquises en utilisant la calibration par défaut de l'appareil.

Pour l'analyse des protéines, l'échantillon est co-cristallisé avec de l'acide sinapinique comme matrice.

#### **Préparation de la matrice acide sinapinique à 5 mg/mL :**

2,5 mg d'acide sinapinique sont solubilisés dans 250 µL d'une solution de 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O. 250 µL d'une solution de 0,1% TFA/Acétonitrile sont ajoutés puis le mélange est soniqué pendant 1 minute. La matrice est alors prête à l'emploi.

### ***XI.8.1.2 Détection en mode réflectron***

Les analyses MALDI-TOF en mode réflectron positif ont été effectuées sur un appareil (MALDI-TOF-TOF 4700 ; Applied Biosystems) équipé d'un analyseur Time Of Flight TOF-4700. La source d'ionisation Matrix Assisted Laser Desorption est constituée d'un laser Nd:YAG d'une longueur d'onde de 355 nm et d'une fréquence de 200 Hz. Les ions formés sont accélérés vers l'analyseur à une tension de 20 kV en mode réflectron. 2500 coups sont accumulés en mode ion positif et les données de spectrométrie de masse sont acquises en utilisant la calibration par défaut de l'appareil.

Pour l'analyse des acides mycoliques sous forme d'ester de méthyle, l'échantillon est co-cristallisé avec de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) comme matrice

#### **Préparation de la matrice DHB à 5 mg/mL :**

2,5 mg de DHB sont solubilisés dans 250 µL de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1 ; v/v). 250 µL d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés puis le mélange est soniqué pendant 1 minute. La matrice est alors prête à l'emploi.

## **XI.8.2 nanoLC-ESI-MS-MS**

### ***XI.8.2.1 Préparation des échantillons***

Les échantillons à analyser par spectrométrie de masse sont déposés sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine 16%. Les bandes colorées au bleu de Coomassie dans la zone entre 3 et 6,5 kDa sont découpées puis les bandes sont lavées afin d'éliminer au maximum le bleu de Coomassie. Ensuite, les bandes sont digérées avec les enzymes souhaitées (Trypsine ou V8-DE) pendant une nuit à 37°C sous agitation (1000 rpm). Les peptides sont alors extraits du gel et sont prêts à être injectés en nanoLC-ESI-MS/MS.

### ***XI.8.2.2 Analyse nanoLC-ESI-MS/MS***

Les digestats peptidiques sont analysés par HPLC capillaire (LC Packings) couplée au Q-STAR®XL. Les peptides sont séparés sur une colonne 75 µm ID x 15 cm C18 PepMap™ (LC Packings). Le débit est fixé à 0,2 µL/min et les peptides sont élués par un gradient d'acétonitrile (Tableau 18). Le spectromètre de masse est utilisé en mode de détection ion positif avec un voltage au niveau de la source de 2 kV. L'analyse s'effectue en mode MS/MS

« data-dependent » c'est-à-dire qu'un scan MS dans la gamme de  $m/z$  300-2000 est suivi de spectres MS/MS dont les ions précurseurs représentent les ions les plus intenses du scan MS.

Temps (minutes)	Tampon A :	Tampon B :
	5% acétonitrile 0.2% acide formique (%)	90% acétonitrile 0.2% acide formique (%)
0	100	0
5	100	0
65	55	45
70	5	95
80	5	95
85	100	0
95	100	0

**Tableau 18** : Gradient utilisé lors de la nanoLC

### ***XI.8.2.3 Interrogations des banques de données***

Le logiciel Mascot en mode « MS/MS search » est utilisé pour l'interrogation des banques SwissProt Trembl. Les paramètres établis pour la recherche sont une digestion à la trypsine ou V8-DE avec au maximum deux sites de coupures manqués, une tolérance de masse sur les différents peptides de  $\pm 0,5$  Da en incluant la présence des modifications suivantes : l'oxydation des méthionines (+16 Da) et la présence d'un acide mycolique sur une sérine (+478 Da).

## **XI.9 Chromatographie en phase gazeuse**

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse sont effectuées avec un chromatographe HP4890A couplé au logiciel de traitement des données « Normasof ». Le programme de température débute à 100°C pour atteindre 310°C à 10°C/min. Un isotherme à 310°C pendant 10 min est utilisé en fin de programme pour éluer les acides corynomycoliques. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme (FID) sont respectivement de 250°C et 300°C. La colonne capillaire est une OV1 de chez Varian de 25 m de long avec un diamètre interne de 0.3 mm. Le gaz vecteur utilisé pour les analyses est de l'Hélium.

## **XI.10 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Les analyses par GC-MS sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890A series II constitué d'une colonne de silice OV1 de 12 m de longueur et de diamètre de 0,3 mm et connecté à un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5989X avec un potentiel d'ionisation de 70 eV (impact électronique). Les conditions pour l'analyse en GC sont les mêmes que décrites précédemment.

## **XI.11 Analyse bioinformatique**

### **XI.11.1 Recherche de candidats pour la protéine X**

La recherche d'ORFs de masse compatible à celle obtenue par spectrométrie de masse pour la protéine X est réalisée sur le génome de *C. glutamicum* ATCC13032 (Kalinowski *et al*, 2003) disponible sur le site « National Center for Biotechnology Information » (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=649>). L'interface du génome sur le site du NCBI permet de sélectionner parmi les ORFs décrites celles codant pour des protéines suivant leur nombre d'acides aminés. Dans notre cas, une fenêtre entre 0 et 45 acides aminés a été choisie, ce qui a permis de sélectionner 39 protéines. Par la suite, nous avons récupéré les séquences de ces protéines avec la méthionine N-terminale et grâce au site ExpASY (<http://www.expasy.ch/>) le masse moléculaire de chaque protéine a été déterminé.

### **XI.11.1 Recherche d'homologues de la protéine cMytC chez les *Corynebacterineae***

La séquence de cMytC de *C. glutamicum* ATCC13032 utilisée est celle correspondant au gène *cg0413* dans le génome disponible sur le NCBI. La recherche de séquences protéiques homologues chez les *Corynebacterineae* est effectuée grâce au logiciel BLAST disponible sur le site du NCBI en utilisant les paramètres par défaut. Les différentes protéines homologues sont ensuite alignées à l'aide du logiciel ClustalW2 hébergé sur le site de l'EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) en utilisant les paramètres par défaut. Le fichier résultat de l'alignement est visualisé par le logiciel BioEdit ou par le logiciel ESPrit (<http://espruit.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) permettant en plus l'alignement de structures secondaires.



## Bibliographie

- Adindla S, Guruprasad K, Guruprasad L (2004) Three-dimensional models and structure analysis of corynemycolyltransferases in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium efficiens*. *Int J Biol Macromol* **34**: 181-189
- Alahari A, Saint N, Campagna S, Molle V, Molle G, Kremer L (2007) The N-terminal domain of OmpATb is required for membrane translocation and pore-forming activity in mycobacteria. *J Bacteriol* **189**: 6351-6358
- Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen PG, Morris HR, Dell A, Sahn H, Eggeling L, Besra GS (2005) Deletion of Cg-emb in corynebacteriaceae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. *J Biol Chem* **280**: 32362-32371
- Alderwick LJ, Seidel M, Sahn H, Besra GS, Eggeling L (2006) Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 15653-15661
- Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D (2001) An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase. *J Mol Biol* **307**: 671-681
- Asselineau C, Asselineau J (1966) Stéréochimie de l'acide corynomycolique. *Bull. Soc. Chim. France* **6**: 1992-1999
- Asselineau J, Lederer E (1950) Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature* **166**: 782-784
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR, Jr. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**: 227-230
- Barksdale L (1959) I. : Lysogenic Conversions in Bacteria. *Bacteriol Rev* **23**: 202-212
- Barksdale L, Kim KS (1977) *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* **41**: 217-372
- Barth E, Barcelo MA, Klackta C, Benz R (2010) Reconstitution experiments and gene deletions reveal the existence of two-component major cell wall channels in the genus *Corynebacterium*. *J Bacteriol* **192**: 786-800
- Barton MD, Goodfellow M, Minnikin DE (1989) Lipid composition in the classification of *Rhodococcus equi*. *Zentralbl Bakteriell* **272**: 154-170
- Bayan N, Houssin C, Chami M, Leblon G (2003) Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol* **104**: 55-67
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422

- Besra GS, Sievert T, Lee RE, Slayden RA, Brennan PJ, Takayama K (1994) Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12735-12739
- Bhamidi S, Scherman MS, Rithner CD, Prenni JE, Chatterjee D, Khoo KH, McNeil MR (2008) The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. *J Biol Chem* **283**: 12992-13000
- Bhatt A, Brown AK, Singh A, Minnikin DE, Besra GS (2008) Loss of a mycobacterial gene encoding a reductase leads to an altered cell wall containing beta-oxo-mycolic acid analogs and accumulation of ketones. *Chem Biol* **15**: 930-939
- Birch HL, Alderwick LJ, Rittmann D, Krumbach K, Etterich H, Grzegorzewicz A, McNeil MR, Eggeling L, Besra GS (2009) Identification of a terminal rhamnopyranosyltransferase (RptA) involved in *Corynebacterium glutamicum* cell wall biosynthesis. *J Bacteriol* **191**: 4879-4887
- Bou Raad R (2010) Caractérisation protéomique de la mycomembrane de *Corynebacterium glutamicum*. Faculté des Sciences d'Orsay. Université Paris-Sud 11, Orsay, p. 225
- Bou Raad R, Meniche X, de Sousa-d'Auria C, Chami M, Salmeron C, Tropis M, Labarre C, Daffe M, Houssin C, Bayan N (2010) A deficiency in arabinogalactan biosynthesis affects *Corynebacterium glutamicum* mycolate outer membrane stability. *J Bacteriol* **192**: 2691-2700
- Brand S, Niehaus K, Puhler A, Kalinowski J (2003) Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol* **180**: 33-44
- Braun V (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **415**: 335-377
- Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of *Mycobacteria*. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63
- Cerdeno-Tarraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res* **31**: 6516-6523
- Chun J, Blackall LL, Kang SO, Hah YC, Goodfellow M (1997) A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 127-131
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544
- Costa-Riu N, Burkovski A, Kramer R, Benz R (2003a) PorA represents the major cell wall channel of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **185**: 4779-4786

- Costa-Riu N, Maier E, Burkovski A, Kramer R, Lottspeich F, Benz R (2003b) Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **50**: 1295-1308
- Daffe M, Brennan PJ, McNeil M (1990) Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analyses. *J Biol Chem* **265**: 6734-6743
- Daffe M, McNeil M, Brennan PJ (1993) Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr Res* **249**: 383-398
- Daffé M (2005) The Cell Envelope of *Corynebacteria*. In Eggeling, L and Bott, M (eds.), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, pp 121-148
- Datta AK, Takayama K (1993) Biosynthesis of a novel 3-oxo-2-tetradecyloctadecanoate-containing phospholipid by a cell-free extract of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim Biophys Acta* **1169**: 135-145
- De Briel D, Couderc F, Riegel P, Jehl F, Minck R (1992) High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. *J Clin Microbiol* **30**: 1407-1417
- De Sousa-D'Auria C, Kacem R, Puech V, Tropis M, Leblon G, Houssin C, Daffe M (2003) New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 35-44
- Dittmer JC, Lester RL (1964) A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res* **15**: 126-127
- Faller M, Niederweis M, Schulz GE (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**: 1189-1192
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6320-6325
- Hermann T (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* **104**: 155-172
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3963-3967
- Huc E, Meniche X, Benz R, Bayan N, Ghazi A, Tropis M, Daffe M (2010) O-mycoloylated proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria. *J Biol Chem* **285**: 21908-21912
- Hunten P, Costa-Riu N, Palm D, Lottspeich F, Benz R (2005a) Identification and characterization of PorH, a new cell wall channel of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochim Biophys Acta* **1715**: 25-36
- Hunten P, Schiffler B, Lottspeich F, Benz R (2005b) PorH, a new channel-forming protein present in the cell wall of *Corynebacterium efficiens* and *Corynebacterium callunae*. *Microbiology* **151**: 2429-2438
- Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 99-109
- Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, Shiba T, Hattori M (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14925-14930
- Jackson M, Raynaud C, Laneelle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Gicquel B, Daffe M (1999) Inactivation of the antigen 85C gene profoundly

- affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol* **31**: 1573-1587
- Jarlier V, Nikaido H (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **172**: 1418-1423
- Kacem R, De Sousa-D'Auria C, Tropis M, Chami M, Gounon P, Leblon G, Houssin C, Daffe M (2004) Importance of mycolyltransferases on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **150**: 73-84
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Kramer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mockel B, Pfefferle W, Puhler A, Rey DA, Ruckert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegrabe I, Tauch A (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**: 5-25
- Kato K, Strominger JL, Kotani S (1968) Structure of the cell wall of *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mechanism of hydrolysis by the L-3 enzyme and the structure of the peptide. *Biochemistry* **7**: 2762-2773
- Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239-253
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660
- Kremer L, Maughan WN, Wilson RA, Dover LG, Besra GS (2002) The *M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett Appl Microbiol* **34**: 233-237
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lea-Smith DJ, Pyke JS, Tull D, McConville MJ, Coppel RL, Crellin PK (2007) The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan. *J Biol Chem* **282**: 11000-11008
- Lemassu A, Daffe M (1994) Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **297**: 351-357
- Lemassu A, Ortalo-Magne A, Bardou F, Silve G, Laneelle MA, Daffe M (1996) Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous *Mycobacteria*. *Microbiology* **142**: 1513-1520
- Lichtinger T, Burkovski A, Niederweis M, Kramer R, Benz R (1998) Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* **37**: 15024-15032
- Lichtinger T, Riess FG, Burkovski A, Engelbrecht F, Hesse D, Kratzin HD, Kramer R, Benz R (2001) The low-molecular-mass subunit of the cell wall channel of the Gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. Immunological localization, cloning and sequencing of its gene *porA*. *Eur J Biochem* **268**: 462-469
- Liebl W (2005) *Corynebacterium* Taxonomy. In Eggeling, L and Bott, M (eds.), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, pp 9-34
- Mahfoud M, Sukumaran S, Hulsmann P, Grieger K, Niederweis M (2006) Topology of the porin *MspA* in the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **281**: 5908-5915

- Makarov V, Manina G, Mikusova K, Mollmann U, Ryabova O, Saint-Joanis B, Dhar N, Pasca MR, Buroni S, Lucarelli AP, Milano A, De Rossi E, Belanova M, Bobovska A, Dianiskova P, Kordulakova J, Sala C, Fullam E, Schneider P, McKinney JD, Brodin P, Christophe T, Waddell S, Butcher P, Albrethsen J, Rosenkrands I, Brosch R, Nandi V, Bharath S, Gaonkar S, Shandil RK, Balasubramanian V, Balganesch T, Tyagi S, Grosset J, Riccardi G, Cole ST (2009) Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science* **324**: 801-804
- Marrakchi H, Bardou F, Laneelle M, Daffé M (2008) A Comprehensive Overview of Mycolic Acid Structure and Biosynthesis. In Daffé, M and Reyrat, JM (eds.), *The Mycobacterial Cell Envelope*. ASM Press, Washington DC, pp 41-62
- McNeil M, Daffe M, Brennan PJ (1990) Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* **265**: 18200-18206
- McNeil M, Daffe M, Brennan PJ (1991) Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem* **266**: 13217-13223
- Meniche X, de Sousa-d'Auria C, Van-der-Rest B, Bhamidi S, Huc E, Huang H, De Paepe D, Tropis M, McNeil M, Daffe M, Houssin C (2008) Partial redundancy in the synthesis of the D-arabinose incorporated in the cell wall arabinan of *Corynebacterineae*. *Microbiology* **154**: 2315-2326
- Minnikin DE (1982) Lipids : complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In Ratledge, C and Stanford, J (eds.), *The Biology of the Mycobacteria*, vol. 1. Academic Press Inc., London, pp 95-184
- Molle V, Saint N, Campagna S, Kremer L, Lea E, Draper P, Molle G (2006) pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Mol Microbiol* **61**: 826-837
- Nadolski MJ, Linder ME (2007) Protein lipidation. *Febs J* **274**: 5202-5210
- Nguyen HT, Trach DD, Man NV, Ngoan TH, Dunia I, Ludosky-Diawara MA, Benedetti EL (1979) Comparative ultrastructure of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* cell envelopes. *J Bacteriol* **138**: 552-558
- Niederweis M, Ehrt S, Heinz C, Klocker U, Karosi S, Swiderek KM, Riley LW, Benz R (1999) Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**: 933-945
- Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H (2010) Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol* **18**: 109-116
- Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E, Sugimoto S, Matsui K, Yamagishi A, Kikuchi H, Ikeo K, Gojobori T (2003) Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res* **13**: 1572-1579
- Nishiuchi Y, Baba T, Hotta HH, Yano I (1999) Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. nova*. *J Microbiol Methods* **37**: 111-122
- Nishiuchi Y, Baba T, Yano I (2000) Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J Microbiol Methods* **40**: 1-9
- Ortalo-Magne A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffe M (1995) Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141**: 1609-1620

- Pitarque S, Larrouy-Maumus G, Payre B, Jackson M, Puzo G, Nigou J (2008) The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 560-565
- Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffe M, Guilhot C (2004) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 314-319
- Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Laneelle MA, Bardou F, Guilhot C, Daffe M (2005) The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J Biol Chem* **280**: 8862-8874
- Puech V, Bayan N, Salim K, Leblon G, Daffe M (2000) Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol* **35**: 1026-1041
- Puech V, Chami M, Lemassu A, Laneelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffe M (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**: 1365-1382
- Puech V, Guilhot C, Perez E, Tropis M, Armitige LY, Gicquel B, Daffe M (2002) Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **44**: 1109-1122
- Rainey FA, Klatt S, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1995) *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 32-36
- Ramulu HG, Adindla S, Guruprasad L (2006) Analysis and modeling of mycolyl-transferases in the CMN group. *Bioinformation* **1**: 161-169
- Rastogi N (1991) Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res Microbiol* **142**: 464-476
- Raynaud C, Papavinasasundaram KG, Speight RA, Springer B, Sander P, Bottger EC, Colston MJ, Draper P (2002) The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**: 191-201
- Rezwan M, Grau T, Tschumi A, Sander P (2007) Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* **153**: 652-658
- Riess FG, Dorner U, Schiffler B, Benz R (2001) Study of the properties of a channel-forming protein of the cell wall of the gram-positive bacterium *Mycobacterium phlei*. *J Membr Biol* **182**: 147-157
- Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, Vissa VD, Belisle JT, Sacchettini JC (2000) Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat Struct Biol* **7**: 141-146
- Ronning DR, Vissa V, Besra GS, Belisle JT, Sacchettini JC (2004) *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. *J Biol Chem* **279**: 36771-36777
- Sani M, Houben EN, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, Wever B, Piersma SR, Jimenez CR, Daffe M, Appelmelk BJ, Bitter W, van der Wel N, Peters PJ (2010) Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog* **6**: e1000794

- Sankaran K, Wu HC (1994) Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **269**: 19701-19706
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
- Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**: 16-22
- Schiffler B, Barth E, Daffe M, Benz R (2007) *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall. *J Bacteriol* **189**: 7709-7719
- Seidel M, Alderwick LJ, Birch HL, Sahm H, Eggeling L, Besra GS (2007) Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in *Corynebacteriaceae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**: 14729-14740
- Sekine M, Tanikawa S, Omata S, Saito M, Fujisawa T, Tsukatani N, Tajima T, Sekigawa T, Kosugi H, Matsuo Y, Nishiko R, Imamura K, Ito M, Narita H, Tago S, Fujita N, Harayama S (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol* **8**: 334-346
- Senaratne RH, Mobasher H, Papavinasundaram KG, Jenner P, Lea EJ, Draper P (1998) Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **180**: 3541-3547
- Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 526-544
- Stahl C, Kubetzko S, Kaps I, Seeber S, Engelhardt H, Niederweis M (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **40**: 451-464
- Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* **11**: 791-801
- Takayama K, Wang C, Besra GS (2005) Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 81-101
- Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J (2002) Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**: 362-367
- Trias J, Jarlier V, Benz R (1992) Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**: 1479-1481
- Tropis M, Lemassu A, Vincent V, Daffe M (2005a) Structural elucidation of the predominant motifs of the major cell wall arabinogalactan antigens from the borderline species *Tsukamurella paurometabolum* and *Mycobacterium fallax*. *Glycobiology* **15**: 677-686
- Tropis M, Meniche X, Wolf A, Gebhardt H, Strelkov S, Chami M, Schomburg D, Kramer R, Morbach S, Daffe M (2005b) The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacteriaceae*. *J Biol Chem* **280**: 26573-26585
- Villeneuve M, Kawai M, Kanashima H, Watanabe M, Minnikin DE, Nakahara H (2005) Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **1715**: 71-80
- Villeneuve M, Kawai M, Watanabe M, Aoyagi Y, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Gouda H, Hirono S, Minnikin DE, Nakahara H (2007) Conformational behavior of

- oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1717-1726
- Villeneuve M, Kawai M, Watanabe M, Aoyagi Y, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Gouda H, Hirono S, Minnikin DE, Nakahara H (2010) Differential conformational behaviors of alpha-mycolic acids in Langmuir monolayers and computer simulations. *Chem Phys Lipids* **163**: 569-579
- Wietzerbin J, Das BC, Petit JF, Lederer E, Leyh-Bouille M, Ghuysen JM (1974) Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of *Mycobacteria*. *Biochemistry* **13**: 3471-3476
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448-452
- Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, Besra GS, Futterer K (2004) The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *J Mol Biol* **335**: 519-530
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**: 387-396
- Ziegler K, Benz R, Schulz GE (2008) A putative alpha-helical porin from *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Biol* **379**: 482-491
- Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffe M (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**: 5672-5680



**Auteur:** Emilie HUC

**Titre :** *O*-mycoloylation : Caractérisation d'une nouvelle modification post-traductionnelle de petites protéines d'enveloppe chez les *Corynebacterineae*.

**Directrice de thèse :** Marielle TROPIS (MCU, HDR, UPS)

**Lieu et Date de la soutenance :** Salle de conférence F.Gallais, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04, le jeudi 3 février 2011.

---

### **Résumé :**

Les *Corynebacterineae* sont des bactéries caractérisées par la présence d'une paroi atypique pour des bactéries Gram<sup>+</sup> avec notamment la présence d'une membrane externe appelée mycomembrane. Cette membrane est constituée majoritairement d'acides mycoliques, acide gras à longue chaîne  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés spécifique des *Corynebacterineae*, que l'on retrouve soit liés à l'arabinogalactane formant le feuillet interne, soit au tréhalose formant le feuillet externe. Dans la plupart des genres de ce sous-ordre, des protéines ont été identifiées au niveau de la mycomembrane. C'est le cas en particulier, des mycoloyltransférases permettant le transfert des acides mycoliques sur leurs accepteurs finaux mais aussi des porines permettant le passage des solutés nécessaires à la survie de la bactérie. Au cours de ce travail, nous avons étudié certaines protéines de la mycomembrane en particulier PorA et PorH chez la souche *C. glutamicum* ATCC13032. Nous avons démontré, en combinant différentes techniques de biochimie des protéines et de spectrométrie de masse, que les protéines PorA et PorH ainsi qu'une troisième protéine inconnue appelée protéine X sont *O*-acylées par un acide mycolique, modification jamais observée chez les bactéries. Nous avons montré que cette modification s'effectue sur la serine 15 de PorA et qu'elle est nécessaire à l'activité porine cation-sélective de l'hétérooligomère PorA-PorH chez *C. glutamicum* ATCC13032. Dans un deuxième temps, nous avons identifié l'enzyme responsable de la mycoloylation par interruption du gène candidat. Il s'agit d'une mycoloyltransférase qui se différencie des autres mycoloyltransférases connues par une boucle d'insertion au niveau de sa structure responsable d'une spécificité de substrat différente. L'identification de cette enzyme nous a permis de rechercher des protéines orthologues chez l'ensemble des *Corynebacterineae*. L'étude des candidats devrait permettre de savoir si ce type de modification post-traductionnelle est commun au sous-ordre des *Corynebacterineae*.

### **Abstract**

*Corynebacterineae* are characterized by the presence of an atypical cell wall for Gram<sup>+</sup> including the presence of an outer membrane called mycomembrane. This membrane is composed of mycolic acids, long-chain  $\alpha$ -alkyl and  $\beta$ -hydroxy fatty acids specifically produced by members of the *Corynebacterineae* suborder, that are found linked by ester bond to arabinogalactan forming the inner layer, or trehalose forming the outer layer. In most genera of this suborder, proteins were identified in the mycomembrane, in particular, mycoloyltransferases allowing the transfer of mycolic acids onto their final acceptors but also porins allowing the transport of solutes necessary to the survival of the bacteria. In this work, we studied some of mycomembrane proteins especially PorA and PorH in strain *C. glutamicum* ATCC13032. We demonstrate, using a combination of protein chemistry and mass spectrometry, the occurrence of three *O*-acylated polypeptides in *Corynebacterium glutamicum*, PorA, PorH and an unknown small protein called protein X, an unprecedented observation in bacteria. The three polypeptides are *O*-substituted by mycolic acids. We show that the post-translational mycoloylation of PorA occurs at S15 and is necessary for the pore-forming activity of PorA-PorH in *C. glutamicum*. In a second step, we identified the protein responsible for mycoloylation by interruption of a candidate gene. The encoded protein is a mycoloyltransferase that differs from other known mycoloyltransferases by the presence of a loop insertion in the predicted structure that is potentially involved in the substrate specificity. The identification of this protein allowed us to search for orthologous proteins in all *Corynebacterineae*. The study of the candidate proteins should indicate whether this type of post-translational modification is common to the suborder *Corynebacterineae*.

---

**Mots-Clés:** *Corynebacterium glutamicum*, enveloppe, modification post-traductionnelle, acides mycoliques, porines

**Discipline :** Biochimie

**Intitulé et adresse du laboratoire :** Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS-UMR5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04