

THESE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'Université Paris 5 Descartes

Spécialité Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Elise GASIOROWSKI

Le 28 septembre 2018

**Élucidation du rôle des phosphatases membranaires
dépendantes de l'undécaprényl pyrophosphate
dans la pathogenèse de *Helicobacter pylori***

Membres du Jury

Dr Isabelle Martin-Verstraete

Présidente de Jury

Dr Ivo Gomperts Boneca

Directeur de thèse

Dr Andrea Dessen et Dr Frédéric Kerff

Rapporteurs

Dr Christophe Beloin et Dr Marie-Pierre Chapot-Chartier

Examineurs



UNIVERSITÉ
**PARIS
DESCARTES**



THESE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'Université Paris 5 Descartes

Spécialité Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Elise GASIOROWSKI

Le 28 septembre 2018

Élucidation du rôle des phosphatases membranaires dépendantes de l'undécaprényl pyrophosphate dans la pathogenèse de *Helicobacter pylori*

Membres du Jury

Dr Isabelle Martin-Verstraete

Présidente de Jury

Dr Ivo Gomperts Boneca

Directeur de thèse

Dr Andrea Dessen et Dr Frédéric Kerff

Rapporteurs

Dr Christophe Beloin et Dr Marie-Pierre Chapot-Chartier

Examineurs



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



A mon Frère, Boris et mon grand-père, Stany

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Andrea Dessen et le Dr Frédéric Kerff d'avoir accepté de rapporter ce travail de recherche. Je remercie également le Dr Marie-Pierre Chapot Chartier, le Dr Isabelle Martin-Verstraete et le Dr Christophe Beloin d'examiner et d'évaluer mes travaux.

Je remercie le DIM maladies infectieuses (île de France) de m'avoir accordé mon allocation doctorale pour les trois premières années et la fondation pour la recherche médicale (FRM) pour cette quatrième année supplémentaire qui m'a permis de terminer ces travaux et cela dans de meilleures conditions.

Je tiens à remercier le Dr Ivo Boneca, Ivo tout court ou encore Big Boss pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein du laboratoire de Biologie et Génétique de la Paroi Bactérienne à l'institut Pasteur. Merci pour ces quatre années à rebondissement. Nous avons navigué entre problèmes techniques et problèmes techniques, des plans A, B, C puis... je pense que nous sommes arrivés jusqu'au plan H mais nous n'avons rien lâché ! Nous avons même fait l'expérience d'une relation Directeur de thèse/Thésarde 2.0 avec ton départ en Corée et des Skype à des heures improbables à cause du décalage horaire. Merci de m'avoir permis de présenter mes travaux à des congrès internationaux. Je te remercie également d'avoir pris le temps de corriger mon manuscrit (même si tu n'aimes pas ce mot, disons alors apporter des suggestions).

Merci Samia, pour m'avoir aidé tout au long de ce doctorat, scientifiquement d'une part en étant mon acolyte d'animalerie et humainement d'autre part, avec des vacances mémorables à Marrakech, en mode incognito dans le désert, ou encore au Portugal, de nombreux apéros, soirées et discussions jusqu'au bout de la nuit. Merci d'avoir été mon amie pendant ces années difficiles.

Merci Karine qui est arrivé en cours de route, pour ta bonne humeur, tes conseils et ta descente aussi difficile à remonter que la mienne (je me suis sentie moins seule...). Merci pour tes remarques sur mon manuscrit et d'avoir vérifié presque quotidiennement que je n'avais pas sombré sous les livres à la bibliothèque !

Merci Nienke, d'avoir pris du temps, beaucoup de temps, pour assister à chacune de mes réunions Phosphatases, pour m'avoir écouté, conseillé et remonté le moral quand toutes les manips allaient de travers.

Je remercie Aline pour avoir fait l'analyse du peptidoglycane en urgence, qui a fait preuve d'une très grande efficacité. Merci pour avoir suivie de près l'écriture de mon manuscrit.

Je tiens à remercier l'équipe PhD student du labo (Christiane, Sofia et Ignacio) pour ces discussions de fin de thèse où la pression est à son paroxysme, les perspectives d'après thèse floues et le moral en berne. C'est bientôt votre tour !

Je tiens également à remercier toute la team BGPB pour leurs conseils et leurs remarques au cours des réunions de labo. Chantal qui a démarré ce projet (je n'écouterai plus jamais RFM de la même façon), Martine, nouvelle voisine de paillasse pour cette dernière année, merci pour ton éternelle bonne humeur.

Je souhaite également remercier Jamila, pour la logistique administrative, les booking d'hôtel, d'avion, de congrès que personne n'a envie de faire. Mais surtout merci pour ces nombreuses soirées et ton rire légendaire !

Je souhaite remercier Hilde et son équipe, pour leurs remarques/conseils à l'époque des réunions communes BGPB/UPH du lundi. Je remercie toutes les personnes du couloir de Duclaux RDC bas.

Je tiens à remercier nos collaborateurs d'Orsay qui ont bravé le périphérique qui nous sépare plusieurs fois pour venir faire des réunions au labo. Merci particulièrement à Thierry Touzé et Rodolphe Auger pour leur gentillesse, bienveillance et disponibilité ainsi que pour les expériences qu'ils ont réalisées permettant de raconter cette histoire.

Je remercie Stephen Trent de l'Université de Géorgie pour l'analyse du lipide A.

Je tiens particulièrement à remercier les personnes de la team couloir partis avant la fin : Eloïse, Lionel, Lamya et Lobna (ça y est c'est écrit, on peut estimer que tu as fait partie de Pasteur). Merci pour votre soutien inconditionnel, ces grands moments de rigolade, ces apéros à rallonge du Vendredi, ces barbecues, ces weekends parisiens. Merci pour votre bonne humeur !! Merci Costa pour ces longues discussions sur l'après thèse qui se terminaient le plus souvent par des : « et puis on verra bien... » Je ne sais pas si le challenge de faire la une de Forbes sera tenu mais je ferai tout pour, promis !

Merci à tous mes amis non scientifiques qui n'ont absolument rien compris à ce que je leur ai raconté pendant 4 ans mais qui ont fait semblant, qui m'ont excusé de ne pas pouvoir être présente à certaines occasions pour cause de manip, de congrès ou d'écriture.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma complice et sœur de toujours, Raphaëlle, pour avoir été là, coûte que coûte, dans les moments les plus durs et les plus beaux depuis le début. Merci Chou d'avoir su rendre les choses plus légères, de m'avoir écouté, entendu et épaulé toutes ces années. Et promis j'arrête là mes études !

Merci Angèle, fournisseuse officielle de chocolat, une belle rencontre, plein de souvenirs mémorables en tête, merci de ton soutien pendant ce doctorat. Next step : Road trip en Grèce toutes les trois !!

Merci Pierre pour avoir supporté au quotidien tous les problèmes de fin de thèse, le stress, les horaires à rallonge sans jamais faillir à ta mission de me faire sourire. Merci de m'avoir nourri tous les soirs pendant l'écriture me faisant gagner un temps précieux et pour tes heures de corrections à lire un manuscrit dans lequel tu comprenais un mot sur trois !

Merci à mon père (qui a fait la couverture de ce manuscrit), ma mère (toujours fidèle au poste), Sandra et JF qui m'ont épaulé dans cette longue aventure. J'espère que vous allez enfin comprendre ce que je fais avec des pipettes depuis 4 ans lors de ma soutenance mais j'ai des doutes...

Enfin merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à rendre plus facile ces quatre dernières années et que je n'ai pas cité.

TABLE DES MATIERES

Table des matières	3
Liste des abréviations	12
Liste des figures	15
Liste des tableaux	16
Introduction	17
Chapitre I. : <i>Helicobacter pylori</i>	19
I. 1. De la mort de Napoléon I au prix Nobel	21
I. 2. Bactérie et pathologies associées	22
I. 2. A. Caractéristiques et virulence bactérienne	22
I. 2. B. Transmission et épidémiologie	28
I. 2. B. a. Réservoirs et transmission	28
I. 2. B. b. Épidémiologie	29
I. 2. C. Pathologies et traitements	31
I. 2. C. a. Pathologies associées à <i>Helicobacter pylori</i>	31
I. 2. C. b. Pathologies extra gastriques	33
I. 2. C. c. Traitement	34
Chapitre II. : L'enveloppe bactérienne	37
II. 1. Les différentes enveloppes bactériennes	39
II. 2. Les bactéries à Gram négatif	41
II. 2. A. La membrane interne	41
II. 2. A. a. Généralité et fonction	41
II. 2. A. b. Voie de biosynthèse des phospholipides	44
II. 2. A. b. 1. L'acylation du Glycérol 3-phosphate en deux étapes et formation du CDP-DAG : précurseur des trois principaux phospholipides	44
II. 2. A. b. 2. Étape de synthèse de la PE	45
II. 2. A. b. 3. Étape de la synthèse du PG et de la CL	46
II. 2. B. La membrane externe	49

II. 2. B. a. Généralités	49
II. 2. B. b. Le LPS	50
II. 2. B. b. 1. Composition et fonction	50
II. 2. B. b. 2. Le lipide A : Biosynthèse et transport	52
II. 2. B. b. 3. L'antigène O : Biosynthèse et transport	57
II. 2. B. b. 4. Assemblage du LPS et transport vers le feuillet externe de la membrane externe	60
II. 2. C. Le peptidoglycane (PGN)	64
II. 2. C. a. Fonction et structure	64
II. 2. C. b. Biosynthèse du Peptidoglycane	65
II. 2. C. b. 1. Étapes cytoplasmiques	65
II. 2. C. b. 2. Étapes membranaires	74
II. 2. C. b. 3. Translocation du lipide II	77
II. 2. C. b. 4. Polymérisation et incorporation du PGN néoformé	79
II. 2. C. b. 5. Importance des enzymes de maturation du PGN	83
II. 2. C. c. Variabilité	87
II. 2. C. c. 1. Variabilité des chaînes de glycane	87
II. 2. C. c. 2. Variabilité de la structure des peptides	88
II. 2. C. d. Recyclage du PGN et implication dans la pathogénèse bactérienne	90
Chapitre III. : Le métabolisme de l'undécaprényl phosphate	95
III. 1. Généralités	97
III. 2. Synthèse du C ₅₅ -PP	98
III. 3. Déphosphorylation du C ₅₅ -PP	101
III. 3. A. Le gène <i>bacA</i>	101
III. 3. B. Les phosphatases acides phosphatidiques de type 2	105
III. 3. C. Les PAP2 de HP	109
Contexte	113
Matériels et méthodes	117
I. 1. Souches et plasmides	119
I. 2. Conditions de culture de HP	121
I. 3. Courbe de croissance	121
I. 4. Efficacité de transformation chez HP	122

I. 5. Sensibilité à la polymyxine B -----	122
I. 6. Colonisation bactérienne dans un modèle murin -----	123
I. 7. Préparation du PGN -----	125
I. 8. Extraction et coloration du LPS de HP -----	126
I. 9. PCR quantitative après rétro-transcription (q-rt-PCR) -----	127
I. 10. Préparation des extraits membranaires -----	128
I. 11. Complémentation fonctionnelle chez <i>E. coli</i> -----	129
Résultats expérimentaux -----	131
Chapitre I. Article en soumission -----	133
Chapitre II. Résultats non publiés -----	171
II. 1. <i>Les PAP2 de Helicobacter pylori</i> -----	173
II. 1. A. Implication dans la croissance bactérienne et la morphologie -----	173
II. 1. B. Mesure de l'expression des PAP2 par PCR quantitative après rétro transcription (q-RT-PCR) -----	174
II. 1. C. Impact des PAP2 dans la pathogénèse de HP -----	178
II. 1. C. a. Colonisation dans un modèle murin -----	178
II. 1. C. b. Structure du PGN -----	180
II. 1. C. c. Structure du LPS -----	183
II. 1. C. c. 1. Structure du lipide A -----	183
II. 1. C. c. 2. L'antigène O -----	185
Discussion générale et Perspectives -----	187
Bibliographie -----	197

LISTE DES ABREVIATIONS

A₂pm : meso-2,6-diaminopimélate
ABC : Transporteur de type ATP-binding cassette
ADP : Adénosine di-phosphate
Ahp : L'alkylhydroperoxyde réductase
Ala : Alanine
anhM : Acide N-acétyl-anhydromuramique
ASA : Asp semi-aldéhyde
Asp : Aspartate
ATP : Adénosine triphosphate
BHI : Brain Heart Infusion
C₁₀-PP : Géranyl-diphosphate.
C₁₅-PP : Farnésyl pyrophosphate
C₅-PP : Isopentényl pyrophosphate
C₅₅-P : Undécaprényl phosphate
C₅₅-PP : Undécaprényl pyrophosphate
CAG : Cholesteryl-6-O-tetradecanoyl- α -DD-glucopyranoside
CAMPs : Peptides antimicrobiens cationiques
CDP-DAG : Cytosine DiPhosphate-DiAcyGlycérol
CFU : Colony Forming Unit
CGL : Cholesteryl- α -DD-glucopyranoside
CL : Cardiolipine
Core OS : Core oligosaccharidique
CPases : Carboxypeptidases
Csd : Cell Shape Determinant
Ct : Cycle Threshold
DHDP : Dihydrodipicolinate
DHDPR : DHDP réductase
DHDPS : DHDP synthase
DTT : Dithiothréitol
EPases : Endopeptidases
FAD : Flavine adénine dinucléotide
G3P : Glycérol 3-phosphate

Gal : Galactose
GL : Glycolipides
Glc : Glucose
GlcN : N-glucosamine
GlcN-1-P : Glucosamine-1-P
GlcNAc-1P : N-acétyl glucosamine 1- phosphate
Glu : Acide glutamique
GPL : Glycophospholipides.
GTase : Glycosyltransférase
Hep : Heptoses
HMM : PBP de Hauts poids moléculaires
HP : *Helicobacter pylori*
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
hTLR2: Human Toll-like receptor 2
hTLR4 : Human Toll-like receptor 4
IITR : Interdigitating inverted-topology repeat
IL-8 : Interleukine-8
Ile : Isoleucine
IPP : Inhibiteur de pompe à protons
LAMP : Technique d'amplification isotherme médiée par des boucles
LB : Lysogeny Broth
LCL : Lysyl-CL
Lipide I : Undécaprényl-pyrophosphate-MurNAc-pentapeptide
LMM : PBP de Bas poids moléculaires
LPA : Acide lysophosphatidique
LPG : Lysyl-PG
LPS : Lipopolysaccharide
Lys : Lysine
MALT : Mucosa Associated Lymphoma Tissue
MD-2: Myeloid differentiation factor 2
Met : Méthionine
MMPE ou DMPE : Mono- ou Di-méthyl-PE
MOP : Multidrug, oligosaccharidyl-lipid, polysaccharide
mTLR4: Murin Toll-like receptor 4
Mur : UDP-N-acetylglucosamine-1-carboxyvinyltransferase

MurNAc : N-acétylmuramique
NOD1: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
OLs : Ornithines
Omps : Outer Membrane Proteins
PA : Acide phosphatidique
PAP2 : Phosphatases acides phosphatidiques de type 2
PBPs : Penicillin-binding proteins
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PGN : Peptidoglycane
PGP : Phosphatidylglycérol phosphate
PgP : Phosphatidylglycérophosphatases
Pi : Phosphate inorganique
PI : Phosphatidyl-inositol
PNPT : Polyprényl-phosphate N-acétyl hexosamine 1-phosphate transférase
PPi : Pyrophosphate inorganique
PS : Phosphatidylsérine
q-RT-PCR : PCR quantitative après rétro-transcription
SDS : Sodium dodécylsulphate
SEDS : Shape, elongation, division and sporulation
SLs : Sphingolipides
SOD : Superoxyde dismutase
SVF : Sérum de veau foetal
THDP : Tétrahydrodipicolinate
Thr : Thréonine
TPase : Transpeptidase
TTC : 2,3,5-chlorure de triphényltétrazolium
UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétyl glucosamine
UDP-MurNAc-pentapeptide : UDP-N-acétylmuramoyl-pentapeptide.
UMP : Uridine monophosphate
UppP : Phosphatase dépendante de l'undécaprényl pyrophosphate
UppS : Undécaprényl-pyrophosphate synthase

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Helicobacter pylori</i> observé en microscopie électronique à balayage. -----	23
Figure 2: Processus de colonisation de la muqueuse gastrique et Facteurs de virulence d' <i>Helicobacter pylori</i> . -----	26
Figure 3: Prévalence de HP dans le monde. -----	30
Figure 4: Niveau de sévérité de la gastrite chronique selon la classification de Sydney. -----	31
Figure 5: Localisation des Ulcères gastroduodénaux et visualisation par endoscopie. -----	32
Figure 6: Pathologies associées à HP. Évolution des maladies liées à HP en fonction du nombre d'années. -----	33
Figure 7: Différentes membranes bactériennes. -----	39
Figure 8 : Structure des phospholipides. -----	42
Figure 9: L'acylation du G3P en deux étapes et formation du CDP-DAG : Précurseurs des trois principaux phospholipides. -----	45
Figure 10: Formation de la PE. -----	46
Figure 11: Biosynthèse du PG et de la CL.-----	48
Figure 12: Structure du LPS d' <i>E. coli</i> .-----	50
Figure 13: Schéma général du Lieu de biosynthèse, d'assemblage et d'export du LPS.-----	51
Figure 14: Étape 1 de la biosynthèse du lipide A : Synthèse du lipide X. -----	53
Figure 15: Étape 2 de la biosynthèse du lipide A : synthèse du lipide IV _A .-----	54
Figure 16: Étape 3 de la biosynthèse du lipide A : Synthèse du Kdo ₂ -lipide A. -----	55
Figure 17: Comparaison des modifications du core interne chez HP, <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> . -----	56
Figure 18: Transport du lipide A-core au travers de la membrane interne par MsbA. -----	56
Figure 19: Voies de biosynthèse de l'antigène O ¹³³ . -----	58
Figure 20: Schématisation de la biosynthèse de l'antigène O chez HP. -----	59
Figure 21: Modélisation des enzymes impliquées dans l'export du LPS vers la membrane externe.-----	61
Figure 22: Redéfinition de la structure du core OS et de l'antigène O. -----	63
Figure 23: Formation de l'UDP-GlcNAc. -----	66
Figure 24: Formation de l'UDP-MurNAc.-----	67
Figure 25: Formation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide. -----	70
Figure 26: Formation des précurseurs du pentapeptide. -----	73
Figure 27: Formation des précurseurs lipidiques. -----	76
Figure 28: Phénotypes observés en microscopie électronique liés à la déplétion de A. PBP1 ; B. PBP2 ; C. PBP3. -----	80
Figure 29: Architecture et arrangement structural de PBP2et du complexe PBP2:MreC de HP ²¹² .-----	81

<i>Figure 30: Polymérisation et incorporation du PGN néoformé.</i>	83
<i>Figure 31: Exemple de profil type de la composition en muuropeptides obtenus après digestion, séparation par HPLC et identification des muuropeptides par spectrométrie de masse de HP souche N6.</i>	83
<i>Figure 32: Morphologies de HP souche 26695.</i>	85
<i>Figure 33: Morphologies de HP souche G27 observées en microscopie électronique à transmission.</i>	86
<i>Figure 34: Modifications de la chaîne de glycanes.</i>	88
<i>Figure 35: Variabilité de la structure des peptides.</i>	89
<i>Figure 36: Recyclage du PGN.</i>	92
<i>Figure 37: Mécanisme d'action des deux classes de prényltransférase.</i>	98
<i>Figure 38: Synthèse du C₅₅-PP.</i>	99
<i>Figure 39: Action de la bacitracine et mécanisme de résistance.</i>	102
<i>Figure 40: Structure cristallographique de la protéine BacA d'E. coli.</i>	104
<i>Figure 41: Mécanisme d'action de la protéine LpxT sur le lipide A du LPS d'E. coli.</i>	107
<i>Figure 42: Structure de la protéine PgpB d'E. coli²⁸⁷.</i>	108
<i>Figure 43: Étapes de modification du lipide A de HP.</i>	111
<i>Figure 44: Courbes de croissance de HP N6.</i>	173
<i>Figure 45: Quantification de l'expression par q-RT-PCR des gènes codant pour les UppP.</i>	174
<i>Figure 46: Mesure de l'expression par q-RT-PCR des gènes codant pour les UppP.</i>	175
<i>Figure 47: Mesure de l'expression par q-RT-PCR des gènes codant pour les UppP.</i>	177
<i>Figure 48: Colonisation de l'estomac de souris OF1 par le mutant hp0350 seul et en compétition.</i>	179
<i>Figure 49: Composition en muuropeptides du PGN des souches de HP N6 sauvage et des quatre simples mutants.</i>	181
<i>Figure 50: Structure du lipide A de HP N6 et des 4 simples mutants.</i>	184
<i>Figure 51: Visualisation de l'antigène O après coloration au nitrate d'argent</i>	185

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Observation de l'infection gastrique depuis 1875 jusqu'à la découverte d'Helicobacter pylori.</i>	21
<i>Tableau 2: Comparaison de la prévalence de l'infection à HP entre 2000 et 2016.</i>	30
<i>Tableau 3 : Prévalence de la résistance primaire de HP aux antibiotiques en France en 2014 (N= 266).</i>	34
<i>Tableau 4: Correspondance des noms et formules des muuropeptides retrouvés en Figure 49.</i>	182

INTRODUCTION

CHAPITRE I. : *HELICOBACTER PYLORI*

I. 1. DE LA MORT DE NAPOLEON I AU PRIX NOBEL

Helicobacter pylori (HP) n'a cessé de faire polémique au cours de l'histoire. Tout d'abord, le 5 mai 1821, jour de la mort de Napoléon Bonaparte où les douleurs stomacales de l'empereur alimentent les conspirationnistes de l'époque. Des chercheurs canadiens, suisses et américains¹ ont par la suite établi qu'il avait succombé à un cancer gastrique favorisé par une gastrite à HP chronique éludant ainsi la théorie de l'empoisonnement à l'arsenic.

Il fallut attendre l'avènement de la bactériologie moderne pour la première observation en 1875 par G. Bottcher et M. Letulle d'une bactérie présente dans des estomacs de patients atteints d'ulcères. Cette théorie ne convainquit pas la communauté scientifique malgré une confirmation par C. Klebs, en 1881, rapportant la preuve d'un organisme bacillaire au sein de la lumière gastrique. W. Jaworski en 1889², mis en évidence pour la première fois, un organisme de forme spiralée dans des sédiments de lavages obtenus d'estomacs humains d'individus autopsiés. Il suggéra que ce pathogène pourrait avoir un rôle dans la pathogénèse gastrique. Même si de nombreuses études se succèdent au cours du XXe siècle³ (**Tableau 1**), aucun scientifique ne valide le 2^{ème} postulat de Robert Koch : « *Un microorganisme doit pouvoir être isolé et croître en milieu de culture pure* ».

Année	Personnalité scientifique	Observations
1875	G. Bottcher / M. Letulle	Démontra la présence de bactéries à côté d'ulcères
1881	C. Klebs	Colonisation bactérienne et « infiltration dans les cellules interglandulaires »
1889	W. Jaworski	Organismes spiralés (<i>Vibrio rugula</i>) dans des lavages gastriques
1893	G. Bizzozero	Spirochètes identifiés dans la muqueuse gastrique de chiens
1896	H. Salomon	Spirochètes dans la muqueuse gastrique - Expérience transférée chez la souris
1906	W. Krienitz	Spirochètes dans le contenu gastrique de patients atteints de carcinome gastrique
1908	F.B. Turck	<i>Bacillus (Escherichia) coli</i> induit un ulcère gastrique chez le chien
1917	L.R. Dragstedt	Bactéries identifiées dans des ulcères, aucun rôle significatif observé
1921	J.S. Edkins	Physiologie expérimentale de <i>S. regaudi (H. felis)</i>
1924	J.M. Luck	Découverte de l'uréase dans le mucus gastrique
1938	J.L. Doenges	Spirochètes/Inflammation chez <i>Macacus monkey</i> et l'Homme
1940	F.D. Gorham	Bactérie acidophile gastrique comme agent étiologique de l'ulcère
1983	J.R. Warren	Identification de <i>Campylobacter pyloridis</i> dans les gastrites humaines (renommé HP)
1983	B.J. Marshall	Isolation et culture de HP
1985-1987	B.J. Marshall/ A. Morris	Ingestion et preuve du pouvoir infectieux d' <i>H. pylori</i> (3 ^{ème} postulat de Koch)

TABLEAU 1 : OBSERVATION DE L'INFECTION GASTRIQUE DEPUIS 1875 JUSQU'À LA DÉCOUVERTE D'*HELICOBACTER PYLORI*.

C'est seulement en 1982, soit 100 ans plus tard, que deux chercheurs australiens, R. Warren et B.J. Marshall, réussissent pour la 1^{ère} fois à isoler la bactérie à partir de biopsies gastriques, qu'ils appelleront *Campylobacter pyloridis*⁴. Pour prouver les 3^{ème} et 4^{ème} postulat de Koch, Marshall s'administra lui-même une solution bactérienne⁵ provenant d'un isolat de patient. 10 jours post-infection, il développa une gastrite aiguë et par une exploration endoscopique confirma la présence du pathogène. A. Morris⁶ réalisa la même expérience peu après, et montra après une antibiothérapie couplée à du bismuth de deux mois, l'éradication de l'organisme pathogène.

En 1989, une étude a démontré que cette bactérie n'appartenait pas au genre *Campylobacter*^{7,8} et renomma ce pathogène ***Helicobacter pylori*** dû à sa forme hélicoïdale et l'origine de son isolation : le pylore de l'estomac. Cette découverte majeure de B.J. Marshall et R. Warren leurs valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005.

I. 2. BACTERIE ET PATHOLOGIES ASSOCIEES

I. 2. A. CARACTERISTIQUES ET VIRULENCE BACTERIENNE

HP est une bactérie (**Figure 1. A.**) bacillaire appartenant à la classe des *ε-proteobacteria*, l'ordre des *Campylobacterales* et à la famille des *Helicobacteriaceae*. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, microaérophile (croissance avec 4% de dioxygène), spiralée⁹, mobile grâce à une ciliature polaire et mesurant 2 à 6µm de long sur 0,5µm de large dont la niche est l'estomac humain. HP existe également sous une autre forme morphologique appelée les cocoïdes (**Figure 1. B.**). La conversion vers ce morphotype apparaît après plusieurs heures de culture ou lors d'un stress particulier que subit la bactérie. Ces formes cocoïdes sont non cultivables à l'heure actuelle et font l'objet de nombreuses études quant à leur fonction notamment sur leur potentiel rôle dans la persistance.

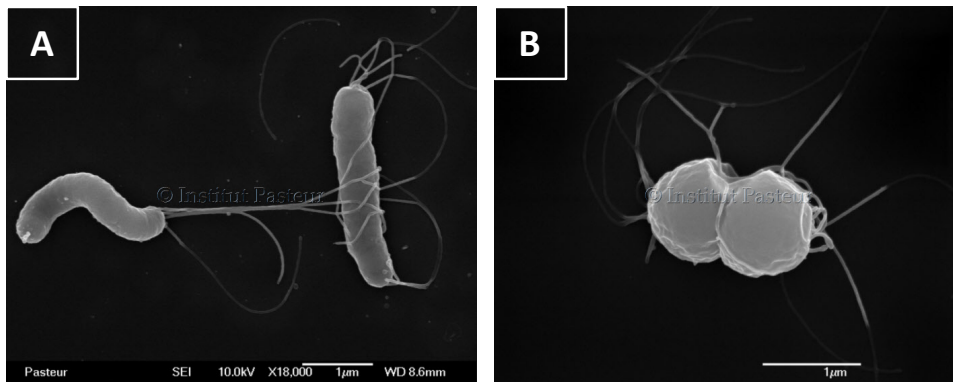


FIGURE 1: *HELICOBACTER PYLORI* OBSERVE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

A. FORME SPIRALEE. B. FORME COCOÏDE. IMAGES REALISEES PAR LE LABORATOIRE EN PARTENARIAT AVEC LA PLATEFORME DE MICROSCOPIE DE L'INSTITUT PASTEUR.

HP possède de nombreux facteurs de virulence (**Figure 2**) qui jouent un rôle clé dans la colonisation et le développement de cette bactérie au sein de l'estomac à plusieurs niveaux. En effet, pour pouvoir s'implanter et se multiplier dans la muqueuse gastrique, HP va devoir faire face et contourner des barrières **chimique, physique et biologique** extrêmement défavorables.

La première barrière est chimique, lors de son arrivée dans l'estomac, HP subit un choc acide dû au pH très faible (≈ 2). Cette bactérie n'est qu'acidotolérante, c'est-à-dire qu'elle n'est pas capable de survivre à long terme à pH acide. Pour pouvoir persister, elle possède une enzyme particulière, l'uréase¹⁰, qui va hydrolyser l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone neutralisant ainsi l'acidité gastrique. En tamponnant son milieu, cela lui permet d'atteindre une zone plus favorable pour pouvoir se multiplier. Par ailleurs, il a été montré que des souches d'HP dépourvues d'uréase étaient incapables de résister à l'acidité gastrique¹¹. En effet, dans un modèle de colonisation, on retrouve une colonisation précoce mais rapidement, on observe à une clairance bactérienne en absence d'uréase.

HP possède généralement de 3 à 5 flagelles qui vont lui permettre d'atteindre rapidement la lumière gastrique puis le mucus où l'acidité y est plus modérée ($\text{pH} \approx 5-6$) et ainsi de coloniser l'estomac humain¹². Le mucus constitue une barrière physique, mais la forme spiralée de HP et ses flagelles lui confèrent la possibilité de se mouvoir à l'intérieur de celui-ci et de s'y multiplier pour enfin atteindre, par chimiotactisme¹³, les cellules épithéliales gastriques où le pH est neutre.

HP possède également des protéases et lipases qui affaiblissent cette barrière en dégradant la mucine (protéine composante du mucus) et les phospholipides de l'épithélium, respectivement. Un certain nombre de bactéries ($\approx 20\%$) adhèrent à la surface des cellules épithéliales grâce à l'expression d'adhésines¹⁴ (BabA et SabA sont les plus connues) qui permettent de résister au péristaltisme et à la desquamation de la muqueuse gastrique.

Un autre facteur bactérien, le lipopolysaccharide (LPS), permet un contact avec la muqueuse gastrique. Le LPS, dont la structure sera développée en détail dans le **Chapitre II. 2. B.** est constitué du lipide A qui permet d'ancrer celui-ci à la membrane externe, d'une partie centrale et de l'antigène-O qui correspondent à des chaînes de sucres plus ou moins longues. L'antigène-O d'HP est particulier puisque dans 80 à 90% des cas, les souches d'HP sont porteuses de motifs antigéniques de type Lewis, Le^X et Le^Y. Ces antigènes sont normalement présents à la surface des cellules épithéliales gastriques humaine. Le LPS, par son activité endotoxique pyrogène, confère de façon générale aux bactéries un fort pouvoir immunogène. Il a été montré que chez HP, le LPS est peu immunogène¹⁵. La présence des antigènes de Lewis proches des cellules eucaryotes pourrait jouer un rôle dans l'échappement immunitaire de la bactérie. De plus, des modifications du lipide A lui confère une faible activité endotoxique et une résistance aux peptides antimicrobiens.

D'autres facteurs de virulence comme l'îlot de pathogénicité *cag PAI* ou encore la protéine vacuolaire VacA interviennent dans la pathogénèse d'HP en induisant une inflammation locale, l'affaiblissement et des lésions de la muqueuse gastrique. Cet îlot n'est pas présent chez toutes les souches d'HP, mais sa présence a été associée à des pathologies plus sévères chez l'Homme¹⁶. Il code pour un système de sécrétion de type IV qui va jouer un véritable rôle de seringue à la surface des cellules épithéliales gastriques et permettre la translocation de certaines macromolécules telles que la protéine oncogène CagA ou encore le peptidoglycane (PGN) de la bactérie. La protéine CagA est capable, une fois phosphorylée d'entraîner des anomalies morphologiques cellulaires dites « becs de colibris », et perturbe le cycle cellulaire épithélial en activant par cascade, l'expression de protéines pro-oncogènes. Elle agit également lorsqu'elle n'est pas phosphorylée en altérant les jonctions cellulaires apicales et induit une perte de la polarité cellulaire¹⁷.

Le PGN, décrit en détail dans le **Chapitre. II. 2. C.** est un composant de l'enveloppe bactérienne. Lors d'une infection bactérienne, des petits fragments du PGN appelés les muropeptides vont être libérés entraînant, par exemple, l'activation des macrophages, l'induction de cytokines et de peptides antimicrobiens, et ainsi activant la dernière barrière qui est biologique (immunologique). Lors de l'infection par HP, le PGN va être « injecté » par le système de sécrétion de type IV et activer la voie NF- κ B dépendante de la protéine *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1* (NOD1). Cette reconnaissance par NOD1 va alors activer la réponse immunitaire de l'hôte par la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8)¹⁸ qui est une cytokine pro-inflammatoire majeure lors du recrutement de cellules immunitaires (en particulier, les neutrophiles) au niveau de la muqueuse gastrique.

La protéine VacA de HP est une cytotoxine multifonctionnelle qui a pour fonction de générer des pores anioniques dans les cellules épithéliales entraînant la fuite d'ions et de petits nutriments. Elle est également capable de former des vacuoles au sein du cytoplasme de la cellule cible. VacA intervient dans l'induction de l'apoptose et enfin, module la réponse immunitaire en perturbant la prolifération des lymphocytes T¹⁹.

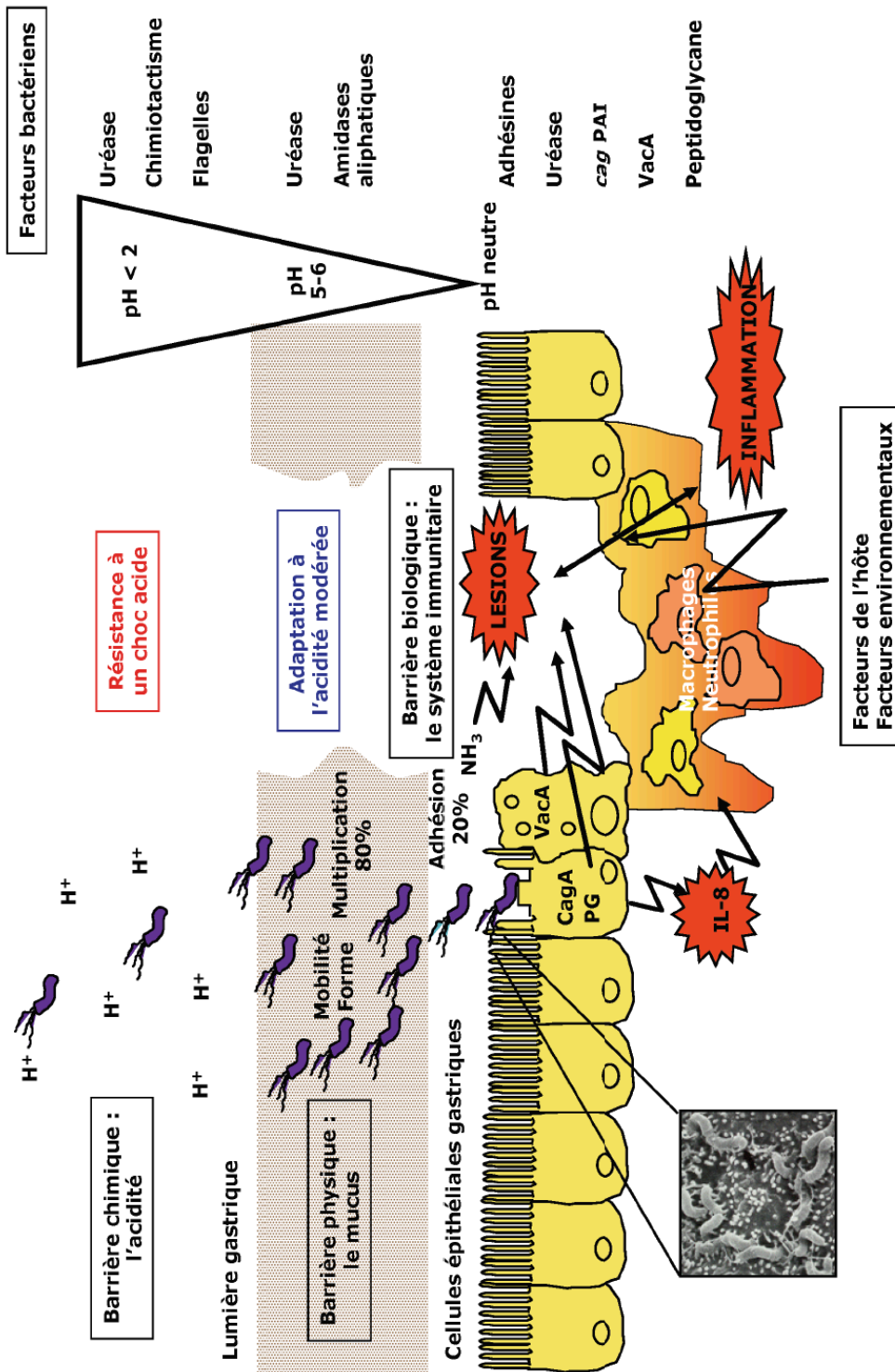


FIGURE 2: PROCESSUS DE COLONISATION DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE ET FACTEURS DE VIRULENCE D'*HELICOBACTER PYLORI*.

HP EST REPRESENTE EN VIOLET.

Tous les mécanismes décrits précédemment permettent à HP de survivre à l'acidité et de se multiplier au sein de l'estomac. Cependant, dès les 1^{ers} stades de l'infection, HP induit une forte réponse immunitaire cellulaire et humorale. Il lui faut donc des moyens pour lutter contre la réponse innée ou acquise du système immunitaire de l'hôte. Pour résister au stress oxydatif généré par les cellules phagocytaires de l'hôte, HP possède trois enzymes. La **superoxyde dismutase** (SOD) qui catalyse la dégradation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène²⁰, la **catalase** qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau²¹ et l'**alkylhydroperoxyde réductase** (Ahp) qui est une NADH peroxydase à thiol qui transfère les électrons du NADH au peroxyde d'hydrogène ce qui entraîne la réduction de ce dernier en molécule d'eau²². En plus de ces trois enzymes, il existe également deux thiorédoxines impliquées dans la résistance au stress oxydatif et nitrosilé²³.

Les acides aminés et l'urée sont les deux principales sources d'azote dans l'estomac, dû à la digestion gastrique. L'ammoniac chez HP est un composé clé intervenant dans le métabolisme de l'azote et dans la résistance aux acides biliaires. HP est capable d'utiliser plusieurs sources alternatives d'ammoniac²⁴ notamment via la dégradation des acides aminés. La principale source d'ammoniac est, comme décrit précédemment, liée à l'uréase de HP. Cependant, HP possède deux amidases, AmiE et AmiF responsables également de la production d'ammoniac.

HP peut aussi se protéger de la production du monoxyde d'azote générée par les macrophages. Cette bactérie exprime pour cela plusieurs composants du cycle de l'urée et est capable de produire de l'urée à partir de l'ammoniac. L'arginase, qui est rarement produite par les bactéries, est une enzyme clé du cycle de l'urée, exprimée chez HP qui protège la bactérie contre le monoxyde d'azote en régulant sa production par les macrophages²⁵.

I. 2. B. TRANSMISSION ET EPIDEMIOLOGIE

I. 2. B. a. RESERVOIRS ET TRANSMISSION

Les mécanismes de transmission et de réservoir de HP font toujours débat dans la communauté scientifique. L'estomac humain est la principale niche de HP²⁶. Cependant, ces dernières années, de nombreuses études décrivent la présence de HP au sein de réservoirs extra-gastriques questionnant ainsi sur les différentes voies de transmission de ce pathogène. Par des méthodes de biologie moléculaire (la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) nichée et la technique d'amplification isotherme médiée par des boucles (LAMP)), par des techniques histologiques, par immunodosages, ou encore par des techniques de détection rapide comme le test uréase, HP a été détecté dans la salive²⁷, les selles²⁸ ainsi que la plaque dentaire^{29,30,31,32}. Ces études favorisent l'hypothèse d'une transmission oro-orale ou féco-orale.

Une très grande variabilité de la fréquence de HP dans la cavité orale est décrite dans la littérature, probablement due à l'utilisation de techniques de détection très variées entre les laboratoires. De plus, les résultats positifs de PCR peuvent provenir d'un HP présent de façon transitoire dans la bouche, mais également de la nourriture ou lié à des reflux gastriques.

Dans la littérature, on retrouve également l'environnement comme réservoir mais principalement dans les pays en développement où HP a été détecté dans des aliments³³ et de l'eau contaminée³⁴ favorisant l'hypothèse d'une transmission féco-orale.

L'acquisition de HP a principalement lieu au cours de la petite enfance et surtout au sein d'une même famille^{35,36}. Dans les pays en développement, les modes de transmission sont des deux types : **oro-orale** (prémastication des aliments, vomissement), **féco-orale** qui peut être soit directe (diarrhée) soit indirecte (contamination des eaux). Dans les pays développés, la transmission féco-orale est très faible due à un niveau d'hygiène sanitaire nettement plus important. Une transmission par voie oro-orale est plus vraisemblable due aux vomissements et à la salive des parents.

I. 2. B. b. ÉPIDEMIOLOGIE

Plus de la moitié de la population mondiale est infectée par HP. Il s'agit d'un chiffre global qui ne souligne pas l'hétérogénéité de la prévalence à HP dans le monde. En effet, les taux d'infection varient de façon significative en fonction des pays, notamment entre pays développés et en développement. Cette différence peut s'expliquer par des conditions d'accès à l'hygiène défavorables.

Pour mettre en exergue cette variabilité, deux équipes ont réalisé une méta-analyse sur la prévalence à HP en 2017³⁷ et 2018³⁸, en sélectionnant selon des critères précis la littérature disponible dans les bases de données scientifiques. Ils ont inclus, respectivement, des publications de 1970 à 2016 (184 études, 410.879 sujets, 73 pays représentés) et de 2000 à 2017 (183 études, 531.880 sujets, 62 pays représentés).

La publication de 2017 scinda son analyse en deux périodes (1970 à 1999 et 2000 à 2016) observant ainsi des changements majeurs dans la prévalence de HP au cours du XXI^e siècle pour les pays développés. En effet, une diminution du taux d'infection de 9% en Europe (de 48,8% avant 2000 à 39,7%) et de 16,1% en Amérique du Nord (de 42,7% à 26,6%) a été observée. Cette diminution se corrèle à une amélioration des conditions socio-économiques et sanitaires dans ces pays ce qui n'est pas le cas dans les pays en développement.

Les données des deux études pour la période de 2000 à 2016 sont synthétisées dans le **(Tableau 2)**. Même si une certaine variabilité est observée dans les taux de prévalence, ces deux études montrent que les régions avec le plus fort taux d'infection à HP sont l'Afrique, l'Amérique latine et les Caraïbes (en rouge). Les régions montrant la plus faible prévalence de HP sont l'Amérique du Nord, l'Océanie et l'Europe (en bleu). La différence observée pour l'Océanie où l'étude de 2018 montre une prévalence plus importante (47,7%) par rapport à l'étude de 2017 (18,7%), n'est pas significative. En effet, l'écart type pour cette région est trop élevé probablement dû au nombre de sujets étudiés insuffisants.

Régions	Étude de 2017 ³⁷			Étude de 2018 ³⁸		
	Nombre (Nb) d'études	Nb de sujets	Prévalence (% , 95% IC*)	Nb d'études	Nb de sujets	Prévalence (% , 95% IC*)
Afrique	5	1150	76,2 (67,3-85)	18	6952	56.7 (43.6-69.9)
Amérique du nord	3	7781	26,6 (19,0-34,1)	11	31462	28.5 (20.7-36.3)
Amérique latine et Caraïbes	9	5132	60,2 (52,0-68,4)	25	18020	59.3 (52.9-65.6)
Asie	53	156563	54,3 (49,7-59,0)	80	270396	44.7 (39.4-50)
Europe	15	27908	39,7 (32,5-46,9)	48	82487	35.3 (29.5-41.2)
Océanie	2	3768	18,7 (11,6-25,7)	3	1812	47.7 (20-75.4)

TABEAU 2: COMPARAISON DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION A HP ENTRE 2000 ET 2016.

IC : INTERVALLE DE CONFIANCE.

Pour conclure sur l'épidémiologie de HP dans le monde, ces deux études confirment que l'infection à HP est une infection globale, mondiale, hétérogène, plus largement répandue dans les pays en développement (50,8% contre 34,7%³⁸) (**Figure 3**).

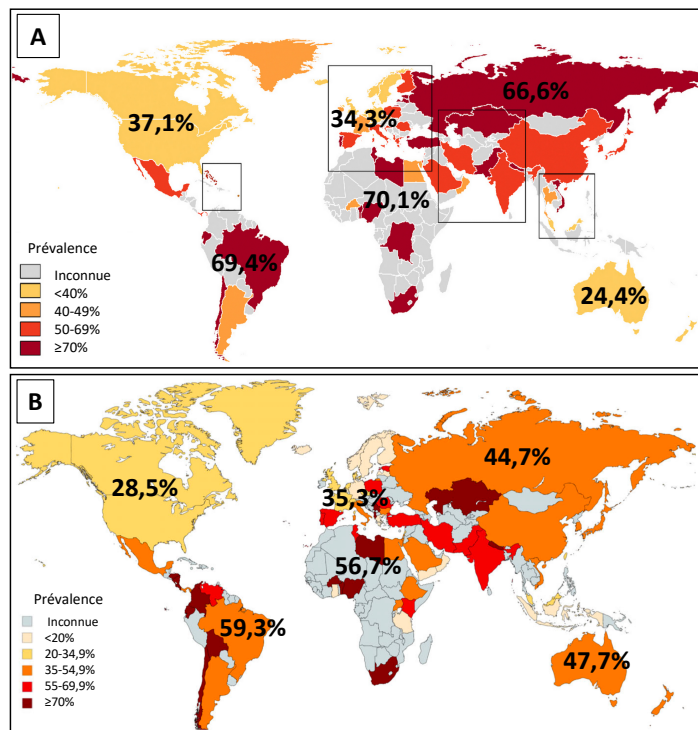


FIGURE 3: PREVALENCE DE HP DANS LE MONDE.

CARTOGRAPHIE DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION A HP, A. EXTRAPOLE AVEC LES VALEURS DE LA POPULATION MONDIALE DE 2015 DE L'ETUDE DE 2017³⁷ ; B. DE L'ETUDE DE 2018³⁸.

I. 2. C. PATHOLOGIES ET TRAITEMENTS

I. 2. C. a. PATHOLOGIES ASSOCIEES A *HELICOBACTER PYLORI*

B.J. Marshall⁵ et R. Morris⁶, respectivement en 1985 et 1987, ont démontré le lien entre l'infection à HP et la gastrite aiguë et chronique. HP induit dans 100% des cas une gastrite chronique. Le diagnostic de celle-ci est histologique et montre une inflammation^{39,40} persistante de la muqueuse gastrique associée à un afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau de l'épithélium gastrique et à une augmentation de la population lymphoplasmocytaires. La classification de Sydney permet définir différents stades de la gastrite chronique (Normal, Léger, Modéré et Sévère), (**Figure 4**). Une endoscopie gastrique avec biopsie gastrique est réalisée afin de diagnostiquer ces paramètres mais en absence de symptômes, seul un examen endoscopique sans prélèvement est réalisé en première intention.

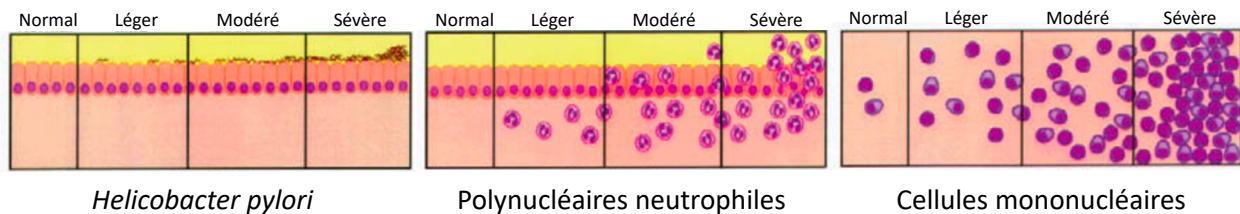


FIGURE 4: NIVEAU DE SEVERITE DE LA GASTRITE CHRONIQUE SELON LA CLASSIFICATION DE SYDNEY.

D'APRES DIXON⁴⁰.

Dans 80% des cas, cette gastrite chronique est asymptomatique. Cependant, des pathologies plus graves peuvent être observées comme :

- Une dysplasie fonctionnelle (5 à 10% des cas) qui correspond à une anomalie du fonctionnement des cellules gastriques,
- Des ulcères (10%) (**Figure 5**) qui correspondent soit à une plaie profonde dans la partie interne au niveau de l'antra de l'estomac provoquée par la diminution de la résistance à l'acidité secondaire à une gastrite diffuse et intense (ulcères gastriques) ; soit dans la première partie de l'intestin, au niveau du bulbe duodénal, résultant d'une hypersécrétion acide induite par la gastrite antrale prédominante et du développement d'une métaplasie gastrique duodénale (ulcères duodénaux⁴¹),

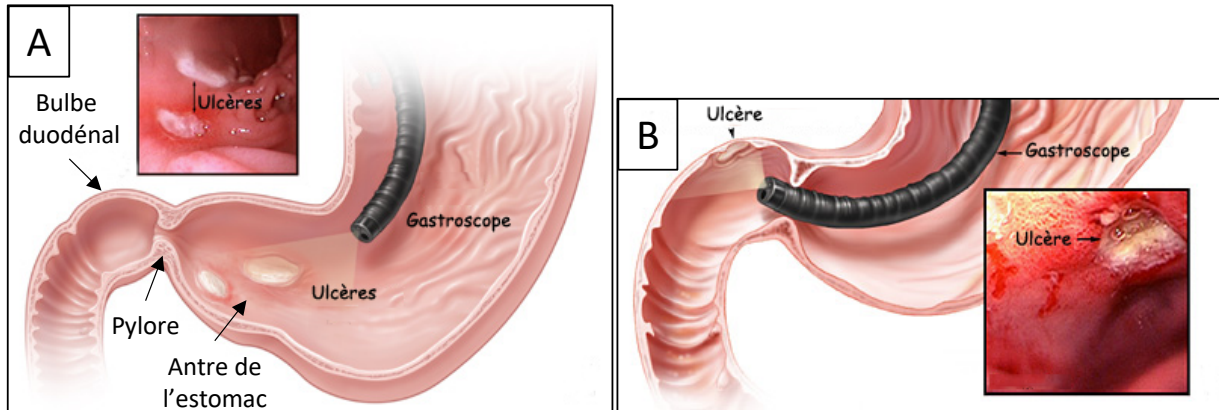


FIGURE 5: LOCALISATION DES ULCÈRES GASTRODUODÉNAUX ET VISUALISATION PAR ENDOSCOPIE.

A : ULCÈRES GASTRIQUES SITUÉS DANS L'ANTRE DE L'ESTOMAC. B : ULCÈRES DUODÉNAUX SITUÉS DANS LE BULBE DUODÉNAL. D'APRÈS⁴².

- Un lymphome de MALT^{43,44} (*Mucosa Associated Lymphoma Tissue*) (0,3%) qui correspond à une prolifération monoclonale des lymphocytes B de la zone marginale des follicules lymphoïdes.
- L'apparition de lésions pré-néoplasiques⁴⁵ telle qu'une gastrite atrophique lorsque les glandes gastriques disparaissent.

La gastrite atrophique peut évoluer vers des pathologies extrêmement sévères, comme une métaplasie intestinale (remplacement des cellules épithéliales gastriques par des cellules épithéliales intestinales) ou encore une dysplasie épithéliale gastrique et enfin dans 1 à 3 % des cas en adénocarcinome de l'estomac⁴⁶. Ce lien entre bactérie et cancer a valu en 1994 de classer HP comme agent carcinogène de classe 1 par l'agence internationale de recherche sur le cancer (**Figure 6**).

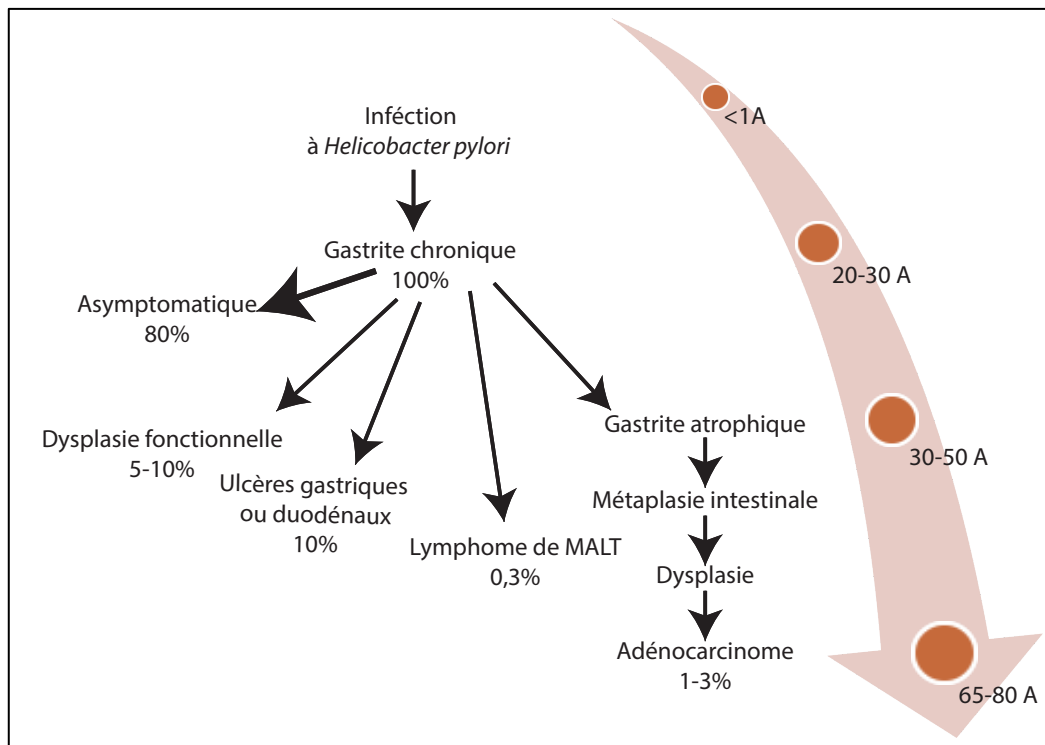


FIGURE 6: PATHOLOGIES ASSOCIEES A HP. ÉVOLUTION DES MALADIES LIEES A HP EN FONCTION DU NOMBRE D'ANNEES.
A : ANNEE.

I. 2. C. b. PATHOLOGIES EXTRA GASTRIQUES

Comme depuis sa découverte, HP continue aujourd'hui, d'être au centre de controverses scientifiques. En effet, l'induction d'une inflammation chronique de la muqueuse gastrique due à l'infection par HP soulève la question de l'implication de HP dans des maladies extra-digestives.

Un lien a été étudié entre HP et des **pathologies vasculaires** (les maladies cardiovasculaires⁴⁷, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques⁴⁸, la maladie de Raynaud⁴⁹ et la migraine⁵⁰), des **pathologies auto-immunes** (le purpura rhumatoïde⁵¹, les troubles auto-immunes de la thyroïde⁵², etc.), des **maladies de la peau**⁵³, et enfin dans **d'autres maladies** telles que le diabète⁵⁴ ou la maladie de Parkinson⁵⁵. Cependant, malgré une littérature riche mettant en cause HP dans de multiples pathologies extra-gastriques, aucune n'a, à ce jour, démontré cette association en respectant les critères de causalité de Hill⁵⁶. Enfin, l'importante prévalence de HP dans le monde suggère que ce pathogène cohabite avec des pathologies diverses ce qui rend le travail des scientifiques délicat pour incriminer cette bactérie.

I. 2. C. c. TRAITEMENT

La localisation de HP dans l'estomac, sa niche, rend le nombre d'antibiotiques utilisables limités pour traiter l'infection. De nombreux schémas thérapeutiques se sont succédé depuis la découverte de HP. Des monothérapies, puis des bithérapies ont été mises en place et abandonnées dû à des taux d'éradications trop faibles²². En 1993, une trithérapie est appliquée associant deux antibiotiques, l'amoxicilline et la clarithromycine ou le métronidazole avec un inhibiteur de pompe à protons (IPP) montrant un taux d'éradication proche de 90%⁵⁷. Cependant, depuis presque 20 ans, des études ont montré une forte diminution de l'efficacité de ce traitement avec une augmentation croissante de la résistance aux antibiotiques, notamment à la clarithromycine entraînant des taux d'éradication proche de 30%. En France, on estime un taux actuel de 22 à 25% de résistance pour la clarithromycine. **(Tableau 3)**.

	Nombre de résistants	% résistants (IC)
Clarithromycine	59	22,2 (17,3-27,7)
Lévofoxacine	41	15,4 (11,3-20,3)
Amoxicilline	2*	0,7 (0-2)
Tétracycline	0	0
Rifabutine	2	0,7 (0,1-2,7)
Métronidazole	121	45,9 (39,8-52,1)

TABLEAU 3 : PREVALENCE DE LA RESISTANCE PRIMAIRE DE HP AUX ANTIBIOTIQUES EN FRANCE EN 2014 (N= 266).

* : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) PROCHE DU SEUIL. D'APRES DUCOURNAU⁵⁸. IC : INTERVALLE DE CONFIANCE

Deux types de résistance peuvent être distinguées, naturelle ou acquise. HP est naturellement résistant à la vancomycine, la polymyxine, le triméthoprim et aux sulfamides. Ce qui est observé depuis plusieurs années avec l'émergence des résistances aux antibiotiques est une résistance acquise. Ce type de résistance est dû à des événements génétiques bactériens tels que l'acquisition de gènes de résistance *via* l'insertion de transposons ou encore par des mutations chromosomiques. Chez HP, les antibiotiques concernés sont les macrolides, les fluoroquinolones, les nitro-imidazolés, l'amoxicilline et les rifampicines.

Une des raisons pouvant expliquer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez HP est le fort taux de mutations spontanées estimé à $1,4 \cdot 10^{-6}$ par nucléotide et par année⁵⁹, ce qui en fait une bactérie unique. En effet, chez d'autres bactéries, le taux de mutations est plus faible, de l'ordre de 10^{-10} comme chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*.

Chez HP, on retrouve par exemple des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour l'ARN ribosomal 23S ayant pour conséquence la résistance aux macrolides comme la clarithromycine.

La résistance aux fluoroquinolones survient grâce à des mutations ponctuelles dans le gène *gyrA* qui va coder pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones⁶⁰. La résistance à l'amoxicilline, qui appartient à la famille des β -lactamines est plus rare (<1%) et probablement due à la faible efficacité de cet antibiotique dans l'estomac. Cet antibiotique va cibler les « *penicillin binding proteins* » (PBPs). Une mutation ponctuelle dans le gène *pbp1* qui code pour une PBP, est le principal mécanisme de résistance à l'amoxicilline conduisant à une perte d'affinité entre l'antibiotique et les PBPs. Il est difficile d'établir une méthode fiable pour tester la résistance de HP au métronidazole car pour que la molécule soit active, elle doit être réduite par la bactérie générant un composé toxique, l'hydroxylamine (impact sur l'ADN bactérien). La réduction de cette molécule est intimement liée au potentiel redox de la bactérie qui lui-même est lié aux conditions environnementales. C'est pourquoi, il est impossible en laboratoire, *in vitro*, de mesurer de façon fiable la résistance à cet antibiotique puisqu'on ne se trouve pas dans des conditions physiologiques pour HP. En ce qui concerne la tétracycline qui est un inhibiteur de la synthèse protéique, la résistance à cet antibiotique est due à une substitution d'un codon AGA en TTC localisé dans le site

de liaison de la tétracycline sur l'ARN 16S⁶¹. Cette substitution affecte l'affinité entre l'antibiotique et le ribosome. La fréquence de cet évènement génétique est très faible d'où le faible taux de résistance. La rifabutine, qui appartient à la famille des rifamycines, n'est utilisée que dans les traitements de HP qu'en cas de multi résistance car cet antibiotique n'est pas sans effets secondaires. Il a pour cible la sous unité β de l'ARN polymérase. Une mutation dans le gène *rpoB* est à l'origine de la résistance à cet antibiotique.

Il est important de noter que l'éradication de HP diminue de moitié le risque de cancer de l'estomac⁶², c'est pourquoi il est nécessaire d'avoir une antibiothérapie ciblée contre ce pathogène. Depuis 2017, le Groupe d'Études Français des *Helicobacter* (GEFH), préconise en première intention, une quadrithérapie bismuthée (Pylera[®] de Aptalis) pendant 10 jours dans les pays où celui-ci est disponible. Pylera[®] se compose de Bismuth, de métronidazole, de tétracycline et d'oméprazole. En absence de ce traitement, il est recommandé une quadrithérapie concomitante pendant 14 jours composée d'amoxicilline, de clarithromycine, et métronidazole auquel est ajouté un IPP soit le rabéprazole, soit l'ésoméprazole.

CHAPITRE II. : L'ENVELOPPE BACTERIENNE

II. 1. LES DIFFERENTES ENVELOPPES BACTERIENNES

Le bactériologiste danois Hans Christian Gram développa en 1884 un protocole de coloration basée sur la structure de l'enveloppe qui permis de classifier les bactéries en deux grands groupes. Celles capables de conserver le violet de Gentiane (coloration du cytoplasme) appelées les bactéries à Gram positif et celles qui se décolorent après ajout d'alcool, appelées les bactéries à Gram négatif. Au cours des années, les scientifiques se sont aperçus qu'il existait également des bactéries dites à Gram variable⁶³ comme, les Corynébactéries impliquant alors un autre type d'enveloppe (**Figure 7**). De façon générale, l'enveloppe bactérienne est une barrière complexe et dynamique visant à délimiter et protéger le cytoplasme bactérien des agressions extérieures.

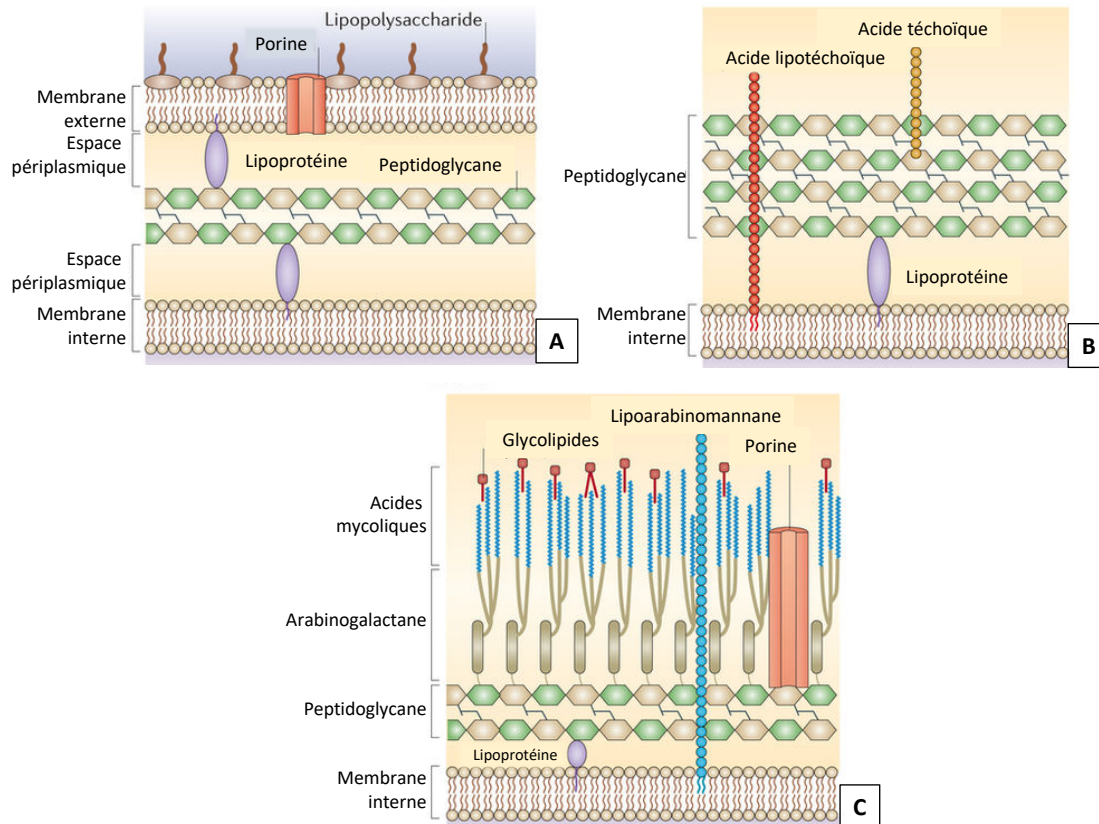


FIGURE 7: DIFFERENTES MEMBRANES BACTERIENNES.

A. STRUCTURE DE LA MEMBRANE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF ; B. A GRAM POSITIF ; C. DES CORYNEBACTERIES. D'APRES BROWN ⁶⁴.

Quatre types d'enveloppe sont décrites dans la littérature, celle des bactéries à Gram négatif (**Figure 7. A.**), à Gram positif (**Figure 7. B.**), des Corynébactéries (**Figure 7. C.**) et celle des mycoplasmes. L'avènement de la microscopie électronique a permis de déterminer de façon précise la structure des différentes enveloppes bactériennes⁶⁵.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée d'une double membrane, externe et interne ou cytoplasmique. L'espace présent entre ces deux membranes, appelé l'espace périplasmique contient une fine couche d'un composé bactérien essentiel : le PGN. Ce type d'enveloppe sera développé en détail dans la partie **Chapitre II. 2.**

Celle des bactéries à Gram positif, quant à elle, ne possède pas de membrane externe mais une membrane interne et une épaisse couche de PGN (**Figure 7. B.**). Ancrés au PGN, sont présents, les acides téchoïques qui correspondent à des polymères anioniques ayant des rôles multiples dans la physiologie cellulaire (forme bactérienne, régulation de la division cellulaire), dans la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques⁶⁶. Les acides lipotéchoïques sont ancrés à la membrane interne et associés de façon non covalente au PGN⁶⁷.

L'enveloppe des Corynébactéries telles que les Mycobactéries est composée d'une membrane interne, d'une fine couche de PGN et d'une membrane externe atypique contenant des acides mycoliques (longue chaîne d'acides gras) et de l'arabinogalactane^{68,69}. Ce dernier est estérifié aux acides mycoliques et lié de façon covalente au PGN.

Enfin, l'enveloppe des mycoplasmes est également particulière puisqu'elle ne possède pas de paroi mais une unique membrane cytoplasmique⁷⁰.

II. 2. LES BACTERIES A GRAM NEGATIF

Comme mentionnée dans la partie **Chapitre 1. II. 1.**, HP est une bactérie à Gram négatif. Ici, nous aborderons, en détail, la structure de l'enveloppe de ce type bactérien et les différentes voies de biosynthèse impliquées dans la formation des composés majeurs de cette enveloppe. Du cytoplasme vers l'extérieur, on retrouve donc, la membrane interne ou cytoplasmique, l'espace périplasmique et la membrane externe.

II. 2. A. LA MEMBRANE INTERNE

II. 2. A. a. GENERALITE ET FONCTION

La membrane interne joue, un rôle protecteur pour le cytoplasme en tant que barrière physique, semi-perméable et sélective, mais également un rôle régulateur de l'homéostasie par l'import et l'export de molécules nécessaires à la viabilité cellulaire. Il s'agit d'une bicouche symétrique, dynamique, composée de protéines composées principalement d'hélices α ⁷¹ ainsi que de lipides qui sont à 95% des phospholipides.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qui possèdent une partie hydrophobe (la queue) et hydrophile (la tête). Ils sont composés d'une base commune, le glycérol, d'un groupement phosphate, de deux acides gras (partie non polaire) et d'un groupement hydrophile variable (partie polaire), (**Figure 8. A.**) qui va définir la nature du phospholipide ainsi que sa charge.

Les principaux phospholipides chez la bactérie *Escherichia coli* sont le phospholipide zwitterionique phosphatidyléthanolamine (PE) et les phospholipides anioniques, phosphatidylglycérol (PG) et cardiolipine (CL) qui représentent, respectivement, 75%, 20% et 5%⁷² des lipides membranaires (**Figure 8. B.**).

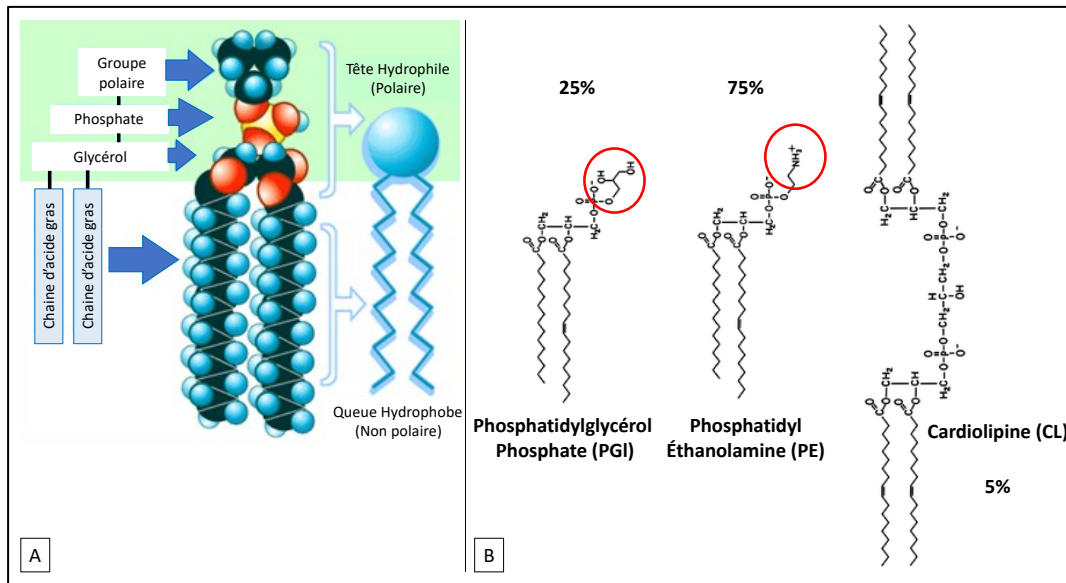


FIGURE 8 : STRUCTURE DES PHOSPHOLIPIDES.

D'APRES⁷³. A. CARACTERISTIQUES GENERALES D'UN PHOSPHOLIPIDE. B. PHOSPHOLIPIDES LES PLUS PREVALANT CHEZ *E. COLI*.

La composition de la membrane interne a été décrite en premier chez l'organisme modèle *E. coli*. Cependant, depuis ces premières descriptions, il existe une littérature scientifique riche sur la composition des phospholipides chez d'autres modèles bactériens. Au regard de ces publications, il est important de noter que la composition de la membrane interne d'*E. coli* est simple et ne reflète pas la grande variabilité des lipides membranaires qui existe entre les espèces bactériennes⁷⁴. La membrane de la plupart des *α-proteobacteria* tels que *Agrobacterium tumefaciens*⁷⁵ ou *Caulobacter crescentus*⁷⁶ est composée de PG, CL et PE mais également de phosphatidylcholine (PC), des lipides ornithines (OLs) ou du mono- ou di-méthyl-PE (MMPE ou DMPE). Chez les *β-proteobacteria* comme *Neisseria gonorrhoeae*⁷⁷ la PE, le PG, la CL et les OLs sont les phospholipides les plus retrouvés. Certaines bactéries de ce groupe possèdent également de la lyso-PE qui est une forme déacylée de la PE. Les *γ-proteobacteria*, comme *E. coli*, ont principalement du PG, de la CL et de la PE mais on peut observer aussi dans leurs membranes, de l'alanyl-PG chez *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁶ ou encore de l'acyl-PG chez *Salmonella typhimurium*⁷⁷. Dans les membranes des *δ-proteobacteria*, la PE et le PG sont bien conservés entre les différentes espèces. On observe

également des sphingolipides (SLs) chez *Myxococcus xanthus*⁸⁰. La majorité des espèces appartenant au groupe des **firmicutes** possède du PG et de la CL mais la PE peut être absente comme chez *Listeria monocytogenes*⁸¹ où l'on trouve de la lysyl-PG (LPG), de la lysyl-CL (LCL) et du phosphatidyl-inositol (PI) en plus du PG et de la CL. Chez *Bacillus subtilis*⁸², en plus du PG, de la PE et de la CL, la membrane est également composée de LPG, de glycolipides (GL) et de glycophospholipides (GPL).

La composition de la membrane des ***ε-proteobacteria*** est plus simple que chez les autres bactéries. En effet, elle est composée majoritairement des phospholipides les plus communs tel que le PG, la CL et la PE. Chez HP, qui appartient à cette catégorie de bactéries, la composition en lipide totale est définie par 6% de lipides neutres, 20,6% de glycolipides (cholesteryl- α -DD-glucopyranoside (CGL) et cholesteryl-6-O-tetradecanoyl- α -DD-glucopyranoside (CAG)) et de 73,6% de phospholipides incluant du cholesteryl-6-O-phosphatidyl- α -DD-glucopyranoside (CPG). Les 73,6% de phospholipides se décomposent en 57,7% de PE, 21,5% de CL, 12,6% de PG, 2% de phosphatidylsérine (PS), 1,6% de PC, 1% de sphingomyélines et 2,9% de CPG⁸³.

La composition en lipide chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* change considérablement durant la phase de croissance. Comme mentionné dans le **Chapitre I. 2. A**, HP a la capacité de passer sous forme cocoïde lors d'un stress, ou après plusieurs jours de culture. La composition des lipides durant cette transition morphologique est modifiée. Une étude a montré que les taux de PC et de PS augmentent pendant la formation des formes cocoïdes. *A contrario*, le taux de PE diminue fortement jusqu'à 29% pendant la conversion. On observe également une diminution de PG corrélée à une augmentation de CL. La formation de CL est catalysée par la condensation de deux molécules de PG, ce qui explique cette corrélation (**Figure 11**). Le CAG augmente approximativement à 18% et le CGL diminue à environ 5%. Enfin, le CPG augmente de 6,5 fois pour arriver à 13% des lipides totaux⁸⁴. Au regard de ces données, HP est donc capable de mettre en place un système de régulation au niveau du métabolisme des lipides en réponse à divers stress environnementaux.

Il est important de noter que HP ne possède pas les enzymes pour la synthèse *de novo* du stérol. C'est pourquoi l'assimilation du cholestérol exogène est essentiel à sa croissance⁸⁵. Une étude⁸⁶ a mis en évidence que HP était capable de suivre un gradient de cholestérol et extraire ce lipide de la membrane plasmique de cellules épithéliales suivie par une conversion de ce lipide en α -glucosides. Les auteurs ont montré que la présence de cholestérol entraînait une diminution significative de la charge bactérienne dans l'estomac avec une augmentation de l'inflammation gastrique. Enfin, l' α -glycosylation du cholestérol (catalysée par la protéine HP0421, l' α -glycosyltransférase) est prérequis pour que HP puisse échapper à la phagocytose, à l'activation des lymphocytes T et la clairance bactérienne *in vivo*⁸⁶.

II. 2. A. b. VOIE DE BIOSYNTHESE DES PHOSPHOLIPIDES

La voie de biosynthèse des glycérophospholipides chez *E. coli* fut décrite par Kennedy et ses collègues au milieu de XXe siècle⁸⁷ puis Raetz⁸⁸ a réalisé une mutagénèse de toutes les enzymes impliquées dans cette voie afin de connaître le rôle exact de chaque enzyme.

II. 2. A. b. 1. L'ACYLATION DU GLYCEROL 3-PHOSPHATE EN DEUX ETAPES ET FORMATION DU CDP-DAG : PRECURSEUR DES TROIS PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES

La première étape de la biosynthèse des phospholipides est l'ajout de deux groupements acyles en position 1 et 2 sur le glycérol 3-phosphate (G3P) pour former de l'acide lysophosphatidique (LPA) puis de l'acide phosphatidique (PA). La première acylation peut être catalysée par deux voies différentes : La voie glycérol-3-phosphate acyltransférase B (PlsB)⁸⁹ avec une seule réaction enzymatique par l'enzyme membranaire du même nom, PlsB et la voie PlsX/Y qui nécessite deux réactions enzymatiques. PlsX est une acyl-phosphate synthase cytoplasmique et PlsY est une acyltransférase membranaire⁹⁰. Il n'y a pas d'homologue de PlsB chez HP, ce qui indiquerait qu'elle utilise la deuxième voie d'acylation. L'homologue de PlsX chez HP est **HP0201**. Aucun homologue de PlsY n'a été décrit à ce jour chez HP. Cependant, en faisant un alignement de séquences protéiques avec la protéine PlsY d'*E. coli* dans le génome de HP 26695 grâce au logiciel BLAST®, ceci permet d'observer que la protéine **HP1509** possède 30,7% d'identité avec PlsY. La deuxième acylation est catalysée par une protéine intégrale de membrane, 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate

acyltransférase C (PlsC) formant ainsi le PA. Le PA est ensuite activé par la protéine membranaire phosphatidate cytidyltransférase A (CdsA) en Cytosine DiPhosphate-DiAcyGlycérol (CDP-DAG). HP possède les homologues de ces deux enzymes qui sont respectivement, PlsC (**HP1348**) et CdsA (**HP0215**) avec 23,3% et 34,2% d'identité (**Figure 9**).

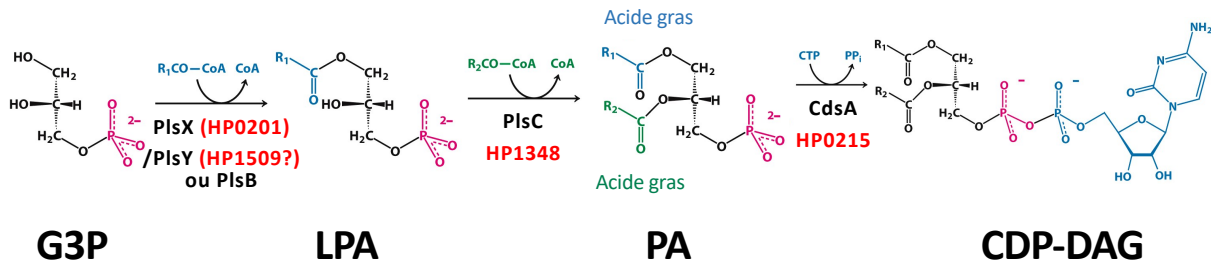


FIGURE 9: L'ACYLATION DU G3P EN DEUX ETAPES ET FORMATION DU CDP-DAG : PRECURSEURS DES TROIS PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES. (LES ENZYMES SONT INDIQUEES EN NOIR (*E. COLI*) ET ROUGE (HP)).

II. 2. A. b. 2. ÉTAPE DE SYNTHÈSE DE LA PE

La phosphatidylsérine synthase A (PssA) va échanger le CDP du CDP-DAG par une L-sérine formant ainsi la PS. La décarboxylation de ce phospholipide catalysée par l'enzyme PS décarboxylase (Psd) va former la PE (**Figure 10**).

L'enzyme transmembranaire PssA est essentielle chez *E. coli*⁹¹. Cependant, le gène *pssA* peut être invalidé en présence d'une concentration non physiologique de Mg^{2+} . Cette enzyme est également présente chez HP. Contrairement à *E. coli*, PssA chez HP est essentielle⁹² même si l'invalidation du gène *pssA* (**hp1071**) est réalisée en présence d'une forte concentration de Mg^{2+} . De façon surprenante, l'enzyme PssA chez HP montre une séquence peu similaire à celle d'*E. coli* alors que ces deux bactéries sont toutes deux à Gram négatif. On retrouve une homologie plus importante entre HP et *Bacillus subtilis* (bactérie à Gram positif) avec 34% d'identité et 54% de similarité.

Psd est essentielle chez *E. coli*. En effet, seuls des mutants avec une enzyme Psd thermolabile ont pu être générés⁹³. Cette étude indique que la croissance bactérienne s'arrête lorsque l'on augmente la température à 42°C, mais uniquement lorsqu'une fraction importante de phospholipides (environ 30%) a été remplacée par de la PS. Le gène *psd* (**hp1357**) chez HP est

également considéré comme essentiel. Néanmoins, l'inactivation de ce gène n'a été testée que par des constructions de bibliothèques de mutants notamment par celle de N. Salama⁹⁴ en insérant un transposon de façon aléatoire dans le génome de HP. Aucun transposon ne s'est inséré au sein de ce gène laissant supposer son essentialité. Il est important de noter que des gènes ayant été décrits comme essentiels dans cette étude ont été obtenus au laboratoire, comme par exemple, *hp0851* et *hp1580* qui font l'objet de cette étude et seront décrits en détail dans le **Chapitre III. 3**.

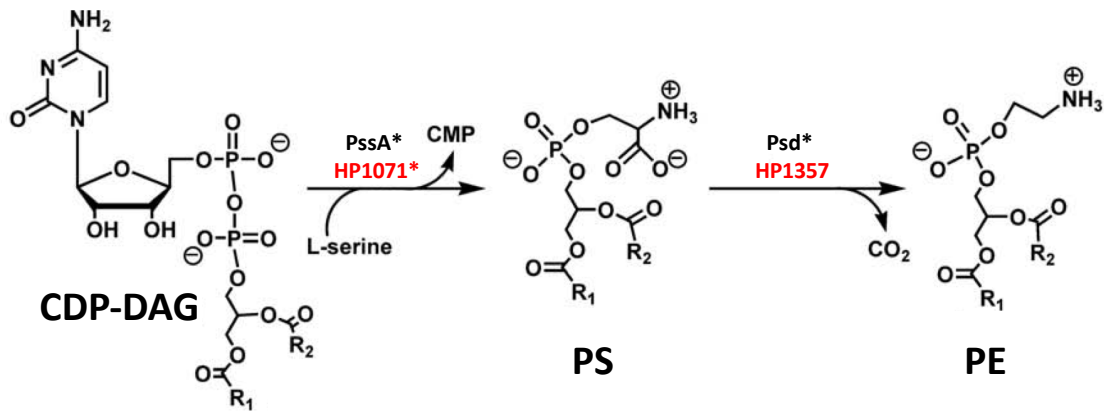


FIGURE 10: FORMATION DE LA PE.

LES ENZYMES SONT INDIQUEES EN NOIR (*E. COLI*) ET ROUGE (HP). LES * : ENZYMES ESSENTIELLES. D'APRES SOHLENKAMP⁷⁴.

II. 2. A. b. 3. ÉTAPE DE LA SYNTHÈSE DU PG ET DE LA CL

La phosphatidylglycérophosphate synthase (PgsA) est la première enzyme impliquée dans la biosynthèse des phospholipides anioniques (**Figure 11**). Elle catalyse le remplacement du groupement CDP du CDP-DAG par un G3P obtenant ainsi le phosphatidylglycérol phosphate (PGP). Il s'agit d'une protéine intégrale de membrane, essentielle chez *E. coli*⁹⁵ et HP. Cependant, de la même façon que pour *psd*, l'essentialité du gène *pgsA* a été établit par une absence d'insertion du transposon Mariner au sein du gène⁹⁴.

Le PGP est immédiatement déphosphorylé en PG (composé essentiel à la viabilité cellulaire). Cette réaction peut s'effectuer par trois enzymes différentes chez *E. coli*, les phosphatidylglycérophosphatases (Pgp) A, B et C. PgpA et PgpB ont été identifiées en premier en

1983^{96,97} et PgpC⁹⁸ (précédemment annoté YfhB) a été décrite 20 ans plus tard en transformant un double mutant *pgpApgpB* par une bibliothèque génomique d'*E. coli*⁹⁹. De façon indépendante, aucune d'entre elles n'est essentielle mais un triple mutant *pgpApgpBpgpC* est létal pour la bactérie. Ce phénotype peut être complémenté par n'importe laquelle des trois Pgp. Ces trois enzymes sont des protéines intégrales de membrane^{97,100} qui ne possèdent aucune similarité de séquence. PgpA et PgpC ont une activité de phosphatase dépendante du Mg²⁺ contrairement à PgpB. PgpA et PgpC ne semblent être impliquées que dans la déphosphorylation du PGP. PgpB quant à elle, est une enzyme multifonctionnelle qui catalyse la déphosphorylation, en plus du PGP, du LPA, du PA et du diacylglycérol pyrophosphate. Cette enzyme est surtout impliquée dans l'activation du transporteur lipidique essentiel, l'undécaprényl phosphate (C₅₅-P) par déphosphorylation de l'undécaprényl pyrophosphate (C₅₅-PP)¹⁰¹. L'implication de cette enzyme dans le métabolisme du C₅₅-P sera développée dans le **Chapitre III. 3.**

De plus, il est important de noter que le site actif de PgpA et PgpC semble faire face au côté cytoplasmique de la membrane interne⁹⁸ alors que le site actif de PgpB est situé du côté périplasmique de la membrane interne¹⁰¹. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans le triple mutant *pgpABC* où PgpA ou PgpC sont surexprimées à l'aide d'un plasmide thermosensible, la quantité de PGP dans la cellule est très faible (proche de la souche contrôle) ce qui n'est pas le cas lors que la surexpression de PgpB (environ 5% de PGP dans les cellules) en dépit de son activité très spécifique démontrée *in vitro*. Cette différence de topologie entre PgpB et les deux autres Pgp pose deux hypothèses : la première est qu'il y a peut-être une source extracellulaire de PGP ou la deuxième qu'il y a un avantage biologique à déphosphoryler le PGP prématurément avant qu'il n'atteigne la face externe de la membrane interne. Par homologie de séquence, une seule Pgp a été identifiée chez HP, PgpA (**HP0737**) indiquée comme essentielle par l'étude de N. Salama⁹⁴.

Le dernier phospholipide majeur chez *E. coli* est la CL. Ce composé provient de la condensation de deux molécules de PG catalysée par la cardiolipine synthase A (ClsA). ClsA¹⁰² est la première enzyme détectée catalysant cette réaction. Un mutant de *clsA* montre l'abolition totale du pool de CL en phase exponentielle de croissance mais une accumulation de CL est observée en

phase stationnaire suggérant la présence d'une autre enzyme assurant cette fonction. Des expériences *in vitro*, ont permis de mettre en évidence une seconde Cls, dénommée ClsB¹⁰³ assurant cette fonction mais cela n'a pas pu être démontré *in vivo*. Une troisième Cls a été décrite dans la littérature, ClsC¹⁰⁴, catalysant la production de CL mais utilisant d'autres substrats. La CL produite par ClsC provient du PG et de la PE. Un triple mutant *clsABC* abolit totalement le pool de CL en phase stationnaire.

Une seule enzyme chez HP par homologie de séquence semble catalyser cette réaction, la protéine **HP0190** qui n'a pas encore été caractérisée mais qui possède 21%, 29% et 32% d'identité avec respectivement ClsA, B et C et qui est supposée essentielle⁹⁴.

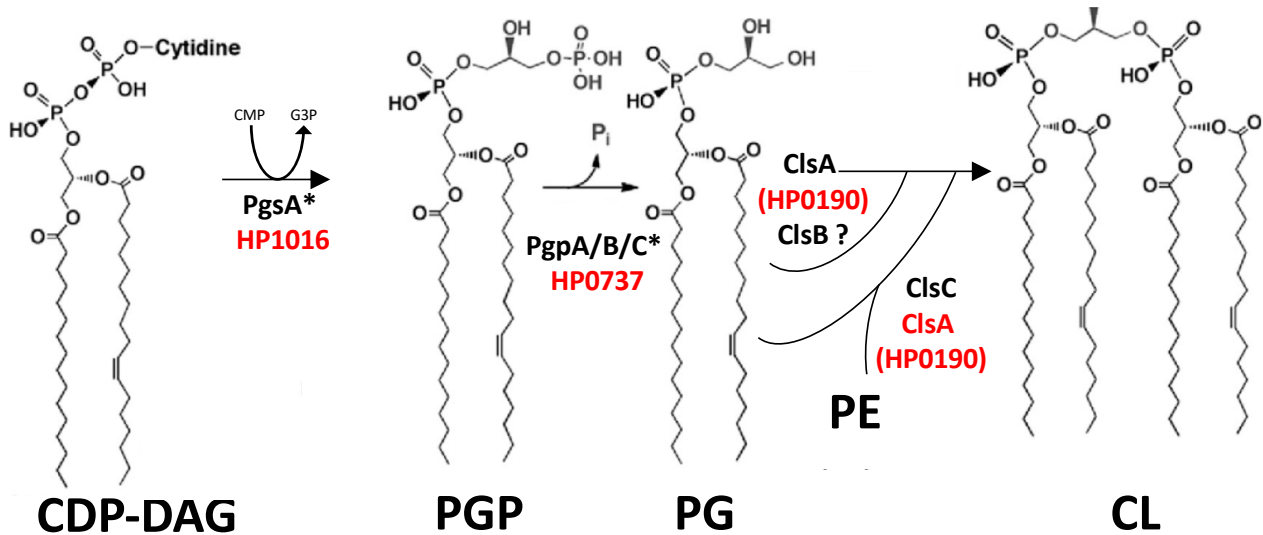


FIGURE 11: BIOSYNTHESE DU PG ET DE LA CL.

LES ENZYMES SONT INDIQUEES EN NOIR (*E. COLI*) ET ROUGE (HP). LES * : ENZYMES ESSENTIELLES. ADAPTE DE LU⁹⁸.

II. 2. B. LA MEMBRANE EXTERNE

II. 2. B. a. GENERALITES

La membrane externe des bactéries à Gram négatif joue un rôle crucial en fournissant à la bactérie une protection directe avec le milieu extérieur. Cette barrière est extrêmement sélective et sophistiquée, notamment grâce à la présence de protéines qui vont former des pores de tailles spécifiques, les protéines « *Outer Membrane Proteins* » (Omps) permettant par exemple, l'import de nutriments. Les propriétés de perméabilité particulières de cette barrière ont un impact majeur dans la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique composée de deux feuillets. L'architecture du feuillet interne de la membrane externe est la même que celle de la membrane interne. En effet, il est composé de phospholipides mais avec un pourcentage plus élevé de PE (90% contre 75% pour la membrane interne) et des acides gras plus saturés. Ce fort pourcentage de PE entraîne une diminution de la charge négative globale de la membrane externe¹⁰⁵. Chez HP, le feuillet interne de la membrane externe est composé de 63% de PE, 15,5% de CL, 10% de lyso-PE, 8,5% de PG, 2% de PC et 1% de lyso-PC¹⁰⁶.

Le feuillet externe est quant à lui, composé de glycolipides anioniques, principalement le LPS^{107,108} encore appelé l'endotoxine bactérienne. Enfin, la membrane externe contient des protéines qui sont généralement divisées en deux classes : les lipoprotéines et les protéines intégrales de membrane en feuillet β . Il existe environ 100 lipoprotéines différentes chez *E. coli*, qui contiennent un fragment lipidique attaché au feuillet interne par un résidu cystéine dans la région N-terminale¹⁰⁹. La plupart des fonctions de ces lipoprotéines restent encore inconnues. Les protéines intégrales de membrane ont généralement pour rôle l'import de nutriments dans la cellule mais peuvent également intervenir dans la sécrétion ou l'adhésion.

II. 2. B. b. LE LPS

II. 2. B. b. 1. COMPOSITION ET FONCTION

C'est en 1892 que le terme d'endotoxine est utilisé pour la première fois par le médecin bactériologiste Richard Pfeiffer. Par la suite, deux microbiologistes anglais, Arthur Felix et Edmund Weil établissent que ces endotoxines sont en réalité des antigènes bactériens de surface qu'ils décident d'appeler "Antigènes O". Chez *E. coli*, il y a environ $2 \cdot 10^6$ molécules de LPS qui recouvrent approximativement 75% la surface bactérienne, le reste étant attribué aux protéines Omps.

Le LPS est composé de trois parties bien distinctes (**Figure 12**) :

- **Le lipide A**, hydrophobe, qui représente la partie lipidique du LPS. Il est ancré à la membrane externe et constitue donc la partie proximale du LPS.
- **L'antigène O**, hydrophile, qui représente la partie saccharidique du LPS. Il est en contact avec le milieu extérieur et constitue donc la partie distale du LPS.
- **Le core** qui sert de lien entre le lipide A et l'antigène O. Le core interne est plutôt hydrophobe et le core externe plutôt hydrophile.

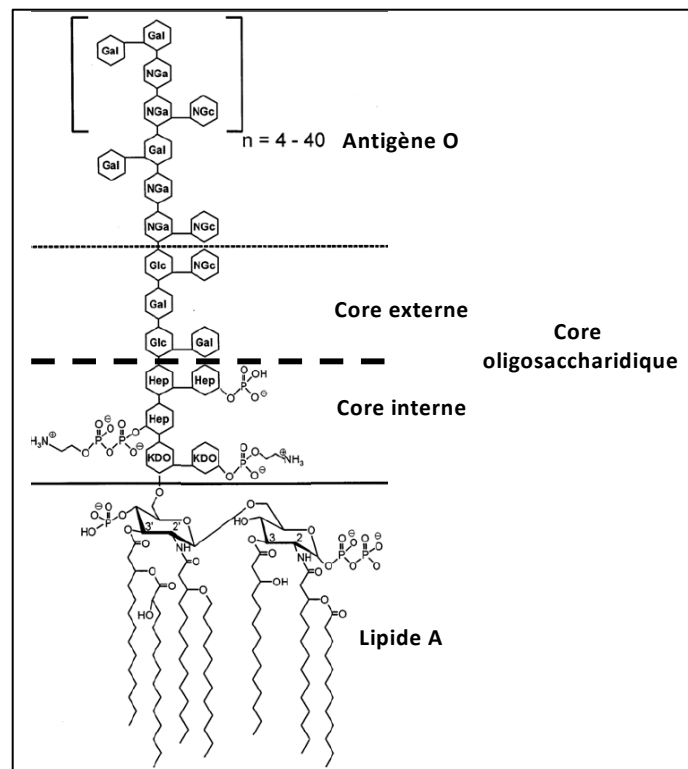


FIGURE 12: STRUCTURE DU LPS D'*E. COLI*.

(HEP) L-GLYCEROL-D-MANNO-HEPTOSE; (GAL) GALACTOSE; (GLC) GLUCOSE; (KDO) 2-KETO-3-DEOXYOCTONIC ACID; (NGA) N-ACETYL-GALACTOSAMINE; (NGC) N-ACETYL-GLUCOSAMINE.

Le lipide A et la partie interne du core sont relativement bien conservés chez les différentes espèces bactériennes. Ceci peut s'expliquer par leurs rôles cruciaux dans le maintien de l'intégrité de cette barrière perméable qu'est la membrane externe. *A contrario*, le core externe et l'antigène O montre une variabilité importante entre les différentes bactéries mais également au sein d'une même espèce. Par exemple, chez *E. coli*, on peut compter plus de 180 antigènes O différents¹¹⁰. En effet, ce composé est soumis à une pression constante puisqu'il est en interaction directe avec l'environnement et exposé aux défenses de l'hôte.

Chez *E. coli*, (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) le lipide A est synthétisé du côté cytoplasmique de la membrane interne par neuf enzymes constitutives, les protéines Lpx, qui sont hautement conservées parmi les bactéries à Gram négatif. Cette cascade enzymatique est appelée la voie de biosynthèse de Raetz. De façon générale, une fois l'assemblage du lipide A réalisé, le core oligosaccharidique (Core OS) est ajouté et l'ensemble est transporté au travers de la membrane interne par un transporteur de type ABC (*ATP-binding cassette*) spécifique, MsbA¹¹¹. Le lipide A-core peut ensuite être additionné ou pas, par des unités polysaccharidiques spécifiques O du côté périplasmique de la membrane interne. Le LPS traverse le périplasma pour arriver dans le feuillet externe de la membrane externe grâce à un autre groupe d'enzymes, les protéines LpT (LPS transport) qui vont créer un « pont » entre la membrane interne et la membrane externe. Les bactéries à Gram négatif ont mis en place différents mécanismes permettant de modifier leur lipide A. Ces modifications ont souvent un rôle étroit dans la pathogénèse.

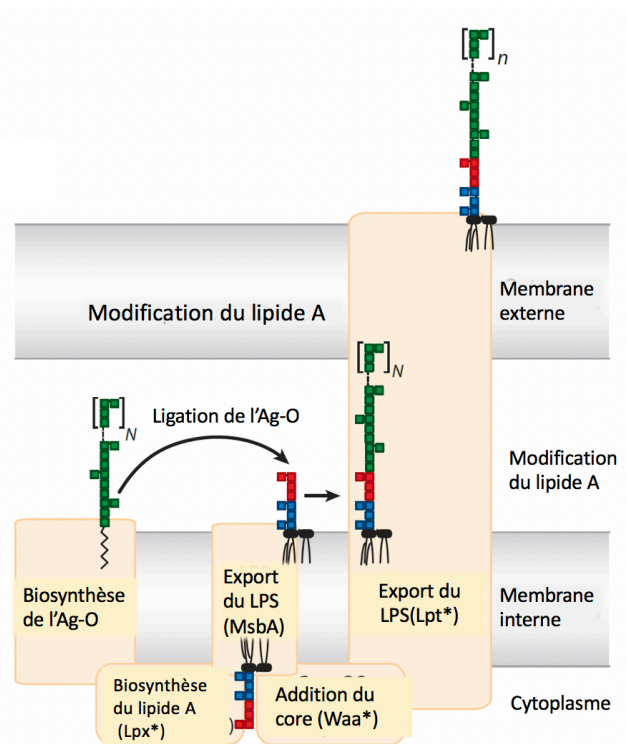


FIGURE 13: SCHEMA GENERAL DU LIEU DE BIOSYNTHESE, D'ASSEMBLAGE ET D'EXPORT DU LPS.

II. 2. B. b. 2. LE LIPIDE A : BIOSYNTHESE ET TRANSPORT

La biosynthèse du lipide A peut se diviser en trois étapes majeures :

- 1) La formation du lipide X (2,3-diacylglucosamine-1-phosphate), (**Figure 14**)
- 2) La formation du lipide IV_A (**Figure 15**)
- 3) La formation du Kdo₂-lipide A (**Figure 16**)

1) Toutes les enzymes conduisant à la formation du lipide X sont cytoplasmiques. La première est l'UDP-GlcNAc acyl-transférase ou **LpxA** qui va ajouter un acide gras en C3 sur l'uridine diphosphate N-acétyl glucosamine (UDP-GlcNAc) formant l'UDP-3-O-acyl-GlcNAc. L'UDP-GlcNAc est également un des précurseurs de la biosynthèse du PGN. LpxA a la capacité d'ajouter des acides gras de longueurs différentes en fonction des espèces bactériennes. Par exemple, l'homologue de LpxA chez HP (**HP1375**) va plutôt ajouter un acide gras à 16 atomes de carbone au lieu de 14 chez *E. coli*¹¹², 10 chez *Pseudomonas aeruginosa*¹¹³ ou encore 12 chez *Leptospira interrogans*¹¹⁴.

LpxC, une métalloenzyme¹¹⁵ essentielle qui lie le Zn²⁺, va ensuite déacétyler de façon irréversible en C2 le complexe pour former l'UDP-3-O-acyl-GlcN. Ce composé présente donc un groupement amine libre pour l'addition d'un nouvel acide gras. L'homologue chez HP est **HP1052**. Il est important de noter qu'aucun homologue de cette enzyme n'a été retrouvé chez les déacétylases et amidases des mammifères, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix¹¹⁶.

L'ajout de cet acide gras va être catalysé par **LpxD**¹¹⁷ en position en C2 formant le UDP-2,3-diacyl-GlcN. Comme pour LpxA, LpxD possède une tolérance pour la longueur de l'acide gras transféré. En effet, un acide gras à 14 atomes de carbone est ajouté pour *E. coli* contre 18 pour HP avec son homologue **HP0196**.

La dernière étape de la formation du lipide X est le clivage de l'UDP-2,3-diacyl-GlcN au niveau de la liaison pyrophosphate formant de l'uridine monophosphate (UMP) et le 2,3 diacyl glucosamine-1-phosphate (lipide X). Cette réaction est catalysée par une enzyme appartenant à la famille des métallophosphoestérases, **LpxH**¹¹⁸. Cette enzyme est absente chez une grande partie des bactéries à Gram négatif, notamment chez les *α-proteobacteria*, ce qui laisse supposer

l'implication d'une autre enzyme catalysant cette réaction. En effet, cette autre enzyme, dénommée **LpxI**, a été identifiée chez *Caulobacter crescentus* grâce à sa localisation. Le gène codant pour cette protéine est situé entre deux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du lipide A, LpxA et LpxB. Cette protéine ne partage aucune homologie avec LpxH mais génère les mêmes produits. L'homologue de LpxH chez HP est **HP0394**.

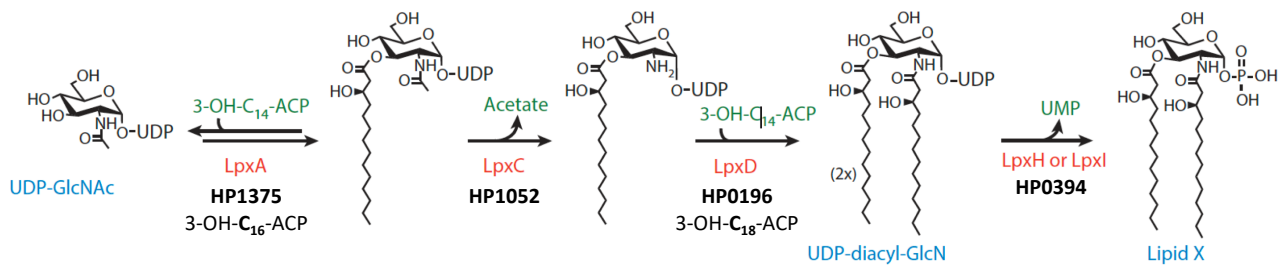


FIGURE 14: ÉTAPE 1 DE LA BIOSYNTHESE DU LIPIDE A : SYNTHÈSE DU LIPIDE X.

ACP : ACYL CARRIER PROTEIN. GLCNAc : N-ACETYL GLUCOSAMINE. GLCN : N-GLUCOSAMINE.

(ADAPTE DE RUBIN¹¹⁹).

2) La formation de l'intermédiaire lipidique tétra-acylé ou lipide IV_A s'effectue en deux étapes. La première est catalysée par l'enzyme glycosyltransférase **LpxB**¹²⁰, en condensant l'UDP-2,3 diacyl-GlcN (produit de LpxD) et le lipide X (produit de LpxH/I). Cette étape libère de l'UDP et forme un composé particulier qui formera le squelette hydrophobe di-saccharidique de glucosamine acylé du lipide A. Ces deux molécules sont reliées par une liaison β-1,6. L'homologue chez HP est **HP0867**. Les étapes suivantes se situent au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne par des protéines intégrales de la membrane interne. La formation du lipide IV_A se termine grâce à une phosphorylation du composé di-saccharidique en position 4 dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) catalysée par la kinase essentielle **LpxK**¹²¹. Son homologue chez HP est **HP0328**.

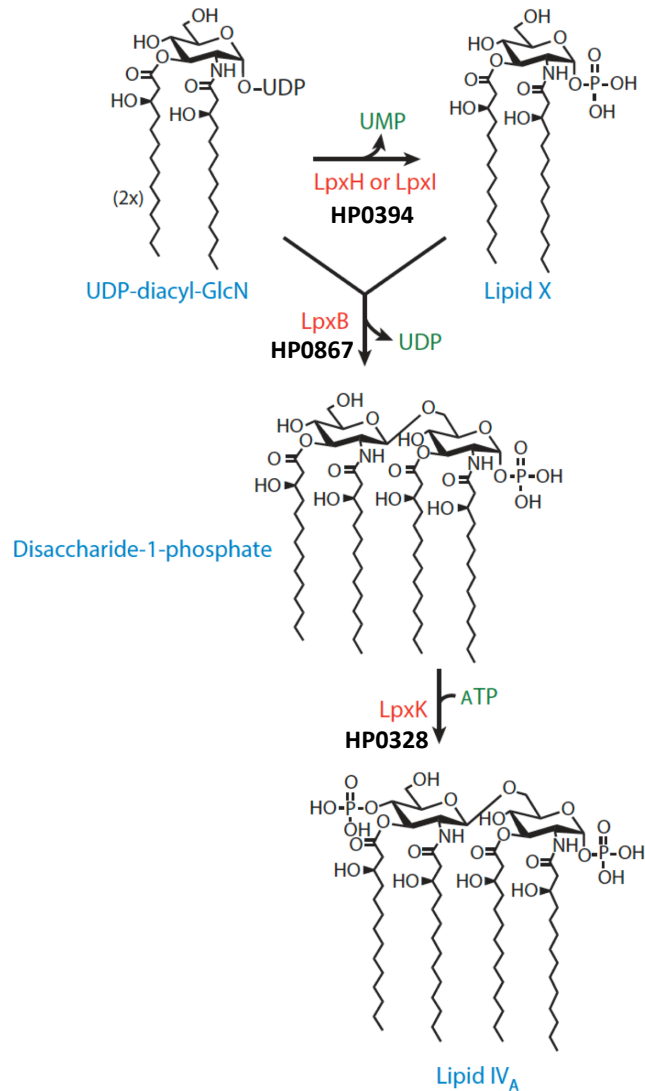


FIGURE 15: ÉTAPE 2 DE LA BIOSYNTHESE DU LIPIDE A : SYNTHÈSE DU LIPIDE IV_A.
(ADAPTE DE RUBIN¹¹⁹).

3) Les étapes suivantes vont conduire à la formation du Kdo₂-lipide A. **WaaA** (ou **KdtA**) catalyse l'ajout d'un nombre variable à partir du carbone 6 de sucre Kdo¹²². Chez *E. coli* et HP (par **HP0957**), le nombre de sucres ajoutés est de deux, formant le Kdo₂-lipide IV_A, alors que pour d'autres microorganismes tels que *Haemophilus influenzae*¹²³ ou encore *Vibrio cholerae*, un seul sucre est ajouté. À l'opposé, KdtA de *Chlamydia*¹²⁴ est capable d'incorporer au moins 3 à 4 sucres Kdo. Le Kdo constitue une première partie du core interne du LPS.

Les deux étapes sont catalysées par des acyltransférases qui vont ajouter successivement deux acides gras. La première acylation est catalysée par **LpxL**, qui chez *E. coli* ajoute un acide gras à 12 carbones¹²⁵ en position 2 alors que son homologue chez HP¹²⁶ (**HP0280**) ajoute un composé à 18 carbones. **LpxM**¹²⁷ est l'enzyme responsable de la deuxième acylation chez *E. coli* catalysant le transfert d'une chaîne d'acide gras à 14 carbones formant un lipide A hexa-acylé. Chez HP, il n'existe pas d'homologue de LpxM. Cependant, la structure du lipide A de cette bactérie a été décrite montrant une forme tétra-acylée majoritaire par des modifications constitutives du lipide A ainsi qu'une forme hexa-acylée (minoritaire) similaire à celle d'*E. coli* suggérant qu'un homologue fonctionnel de LpxM est présent chez HP et capable d'ajouter un acide gras à 12 ou 14 carbones. **HP0270** est une enzyme qui ne possède aucune homologie avec LpxM ou LpxL mais est capable de compléter le phénotype hexa-acylé du lipide A dans un mutant *lpxM* penta-acylé chez *E. coli*. L'équipe qui a mis en évidence cette protéine par une analyse bio-informatique avance également avoir montré par radio marquage du lipide A, cette activité acyltransférase spécifique *in vitro* (données non publiées). De plus, l'inactivation du gène *hp0270* est létale pour HP¹¹⁹.

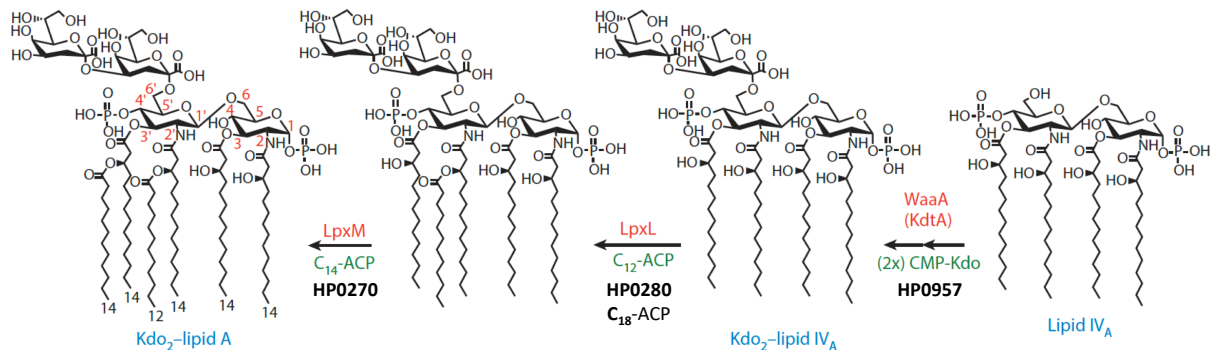


FIGURE 16: ÉTAPE 3 DE LA BIOSYNTHESE DU LIPIDE A : SYNTHÈSE DU KDO₂-LIPIDE A.
LES ENZYMES SONT INDICÉES EN ROUGE (*E. COLI*) ET NOIR (HP). (ADAPTE DE RUBIN¹¹⁹).

Le Kdo₂-lipide A nouvellement formé va servir de support à l'assemblage des oligosaccharides du core du côté cytoplasmique de la membrane interne. Généralement, le core interne est composé des sucres Kdo et de trois unités d'heptoses (Hep I, II et III) et le core externe, de monosaccharides tels que du glucose (Glc) ou du galactose (Gal) qui servira d'attache à l'antigène O. Contrairement à *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* qui ont un core interne chargé plutôt

négativement, HP subit des modifications réduisant la charge négative de celui-ci. Par exemple, le motif Hep III n'est pas phosphorylé comme la plupart des bactéries mais un disaccharide Gal-Glc y est transféré. On retrouve également l'ajout par HP1417 d'un groupement PE sur l'Hep I réduisant ainsi la charge négative du core interne (**Figure 17**).

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 17: COMPARAISON DES MODIFICATIONS DU CORE INTERNE CHEZ HP, *E. COLI* ET *P. AERUGINOSA*.
(ADAPTE DE LI¹²⁸)

Le Kdo₂-lipide A-core OS constitue le LPS de forme « *Rough* ou R-LPS » donnant des colonies de type rugueux. En revanche, il ne s'agit pas de la forme la plus courte du LPS viable observable. En effet, une mutagénèse par rayonnement Ultra-violet¹²⁹ a permis de mettre en évidence différentes formes de LPS classées en fonction de la taille du core, du plus long (Ra) au plus court (Re) où la forme Re se compose uniquement du lipide A avec le Kdo.

Une fois assemblé, le Kdo₂-lipide A-core OS va être transporté du côté périplasmique de la membrane interne par la flippase MsbA¹³⁰ (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). L'homologue de MsbA chez HP est **HP1082**. MsbA est un transporteur de la superfamille des ABC transporteurs. La déplétion de cette protéine entraîne une accumulation de LPS dans la membrane interne d'*E. coli*.

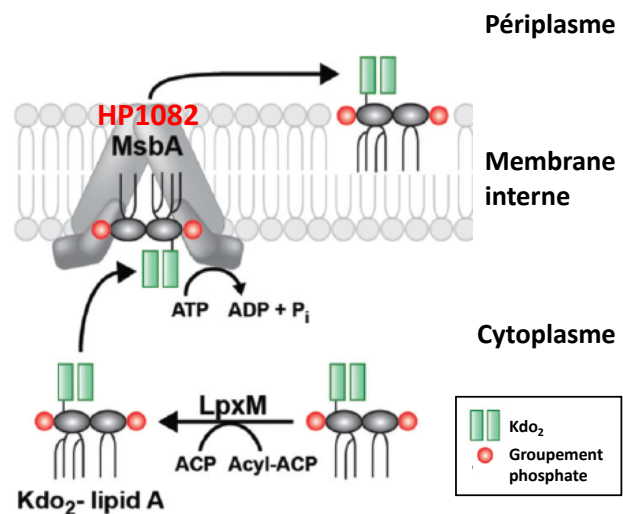


FIGURE 18: TRANSPORT DU LIPIDE A-CORE AU TRAVERS DE LA MEMBRANE INTERNE PAR MSBA.
(ADAPTE DE RUBIN¹²⁷).

II. 2. B. b. 3. L'ANTIGÈNE O : BIOSYNTHESE ET TRANSPORT

L'antigène O du LPS est une structure hyper variable inter et intra espèces. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène O chez HP ne sont pas comme pour la plupart des bactéries organisés au sein du même cluster (l'opéron *rbf*) mais dispersés de façon aléatoire dans le génome. Ceci a rendu la caractérisation de cette voie de biosynthèse difficile et certaines étapes restent encore inconnues. La biosynthèse de l'antigène O se fait de façon indépendante à la biosynthèse du lipide A.

La première étape est commune¹³¹ aux bactéries et catalysée à la face cytoplasmique de la membrane interne par la protéine intégrale de membrane, **WecA**, **HP1581**¹³² chez HP, en transférant du N-acétyl glucosamine 1- phosphate (GlcNAc-1P) sur le transporteur essentiel undécaprényl phosphate (C₅₅-P) formant le C₅₅-PP-GlcNAc (**Figure 20**). Un mutant invalidé pour le gène *wecA* ne possède pas d'antigène O.

Les trois voies principales misent en évidence à ce jour de biosynthèse de l'antigène O diffèrent par leurs mécanismes de polymérisation et de translocation. Elles sont :

- La voie dépendante de Wzy (**Figure 19. A**)
- La voie dépendante d'un ABC-transporteur (**Figure 19. B**)
- La voie dépendante des synthases (**Figure 19. C**)

Dans la voie dépendante de Wzy, seulement un court antigène O est assemblé dans le cytoplasme. Les sous-unités sont ensuite transportées dans le périplasme par la flippase Wzx puis polymérisées par Wzy *via* le régulateur Wzz avant d'être assemblées au lipide A-core OS. Pour les deux autres voies, la seule différence se fait au niveau du transport. En effet, la totalité de l'antigène O est synthétisée du côté cytoplasmique de la membrane interne. Pour la seconde, Wzm forme un canal dans la membrane interne pour le passage de l'antigène O et Wzt fournit l'énergie nécessaire à ce passage par un mécanisme ATP dépendant. La dernière voie implique la glycosyltransférase WbbF qui va, seule, transporter l'antigène O dans le périplasme.

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 19: VOIES DE BIOSYNTHESE DE L'ANTIGENE O¹³³.

A. VOIE Wzx/Wzy. **B.** VOIE DEPENDANTE D'UN ABC TRANSPORTEUR. **C.** VOIE DEPENDANTE DES SYNTHASES. DANS CHAQUE EXEMPLE EST INDIQUE LE CLUSTER DE GENES IMPLIQUE. UND-P: C₅₅-P. LES CHIFFRES DE 1 A 5 CORRESPONDENT AUX ETAPES SUCCESSIVES DE CHAQUE VOIE. CHAQUE RESIDU DE SUCRE EST REPRESENTÉ PAR UN SYMBOLE DIFFÉRENT.

Chez la plupart des souches de HP, l'antigène O s'étend en ajoutant de façon séquentielle des résidus de Gal et de GlcNAc par différentes glycosyltransférases, ce qui constitue le squelette de sucre. Il en existe deux types. Le type 1 qui lie le Gal et le GlcNAc avec une liaison β -1 \rightarrow 3¹³⁴ qui donne les antigènes de Lewis a et b et le type 2, avec une liaison β -1 \rightarrow 4¹³⁵ qui donne les antigènes de Lewis x et y. Des résidus de fucose sont ensuite ajoutés grâce à des fucosyltransférases¹³⁶ (FutA, FutB et FutC) sur les résidus précédents créant ainsi la diversité antigénique chez HP (**Figure 20**). Une fois cet antigène glycosylé, il a besoin d'être transporté au travers de la membrane interne jusque dans le périplasme. L'analyse du génome du HP, n'a pas permis de mettre en évidence une flippase classiquement impliquée dans les trois voies de biosynthèse de l'antigène O. Cependant, un homologue d'une autre flippase impliquée dans des voies de N-glycosylation de certaines protéines chez *Campylobacter jejuni* (PglK) a été identifié chez HP alors même que ce type de modification n'a pas été décrit chez cette bactérie¹³⁷. Ceci implique que cette protéine soit utilisée dans un autre processus chez HP. Une équipe canadienne¹³² a pu mettre en évidence cette protéine appelée **Wzk (HP1206)**, en décrivant son caractère essentiel quant à l'exposition de l'antigène O de HP. La voie de biosynthèse de l'antigène O chez HP s'apparente donc à la voie dépendante des synthases chez *E. coli* où la protéine WbbF est remplacée par Wzk.

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 20: SCHEMATISATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ANTIGENE O CHEZ HP.

(ADAPTE DE RUBIN¹¹⁹). SYNTHÈSE DANS LE CYTOPLASME, TRANSPORT AU TRAVERS DE LA MEMBRANE INTERNE PAR WZK ET ASSEMBLAGE AVEC LE LIPIDE A DANS LE PERIPLASME PAR WAAL.

II. 2. B. b. 4. ASSEMBLAGE DU LPS ET TRANSPORT VERS LE FEUILLET EXTERNE DE LA MEMBRANE EXTERNE

Finalement, la chaîne d'antigène O une fois complète chez HP se détache du C₅₅-PP et est transférée sur le lipide A-core OS grâce à la protéine **Waal (HP1039¹³²)** formant le LPS mature (**Figure 20**). Cette étape libère donc le transporteur lipidique sous forme inactive C₅₅-PP qui va pouvoir être recyclé. J'aborderai en détail l'importance de ce transporteur et son mécanisme d'activation dans le **Chapitre III**. Comme avec le gène *wecA*, un mutant invalidé pour le gène *waal* ne possède pas d'antigène O.

Le LPS mature va alors être transporté au travers du périplasma et passer la membrane externe pour se retrouver exposé à la surface de la bactérie. Ce transport est réalisé par les protéines Lpt. Ce complexe protéique va former un pont entre la membrane interne et la membrane externe. LptF et LptG sont des protéines transmembranaires localisées dans la membrane interne. Ces deux protéines avec LptB forme un complexe protéique dépendant de l'ATP qui va utiliser l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP pour détacher le LPS mature de la face périplasmique de la membrane interne. Le complexe LptE et LptD forme un canal traversant la membrane externe. Ce canal est nettement plus large que la taille des autres canaux présent chez *E. coli*, environ 1,8nm¹³⁸. Ce complexe est responsable de la correcte insertion du LPS dans la membrane externe.

Pour atteindre la membrane externe, un modèle a été proposé basé sur la formation d'un pont protéique entre l'ABC transporteur de la membrane interne et le canal de la membrane externe. La protéine LptC interagit avec LptG au niveau de la membrane interne. Cette protéine va servir d'ancrage au pont protéique réalisé par la protéine LptA. Cette dernière est donc reliée du côté de la membrane interne par LptC et du côté de la membrane externe par LptD. Le LPS va alors suivre ce pont et va pouvoir être exposé à la surface de la bactérie (**Figure 21. A.**). Le système Lpt décrit chez *E. coli* n'est pas bien conservé chez les bactéries¹³⁹.

HP semble posséder toutes les protéines impliquées dans le transport vers la membrane externe. Cependant, même si certaines protéines montrent une homologie importante avec *E. coli*, d'autres présentent une homologie très faible. En effet, seuls LptB (**HP0715**) et LptD (**HP1215**) sont extrêmement bien conservés chez HP avec 55% et 26% d'identité et 75% et 49% de similarité respectivement¹⁴⁰ (**Figure 21. B.**). **HP0362** et **HP1498** sont les homologues putatifs de LptF et LptG et n'ont été identifiés chez HP qu'après comparaison entre *H. hepaticus*, *E. coli* et *Nisseria meningitidis*. **HP1568** est l'homologue putatif de LptA chez *E. coli*. Une très grande similarité a été observée dans la région centrale de la protéine mais de très grande divergence sont observées dans les régions N- et C-terminale. Aucun homologue n'a été retrouvé chez HP pour les protéines LptC et LptE. Cependant, une étude a montré qu'une présumée lipoprotéine **HP1546** partage un domaine commun caractéristique de LptE au même locus que celui-ci en aval du gène *leuS* et semble être le cas pour toutes les ϵ -proteobacteria¹⁴¹. De la même façon, une protéine conservée chez les ϵ -proteobacteria est située au même locus que *lptC* directement en amont du gène *lptA*. **HP1569** mais possédant uniquement une similarité sur les 100 premiers résidus de la protéine.

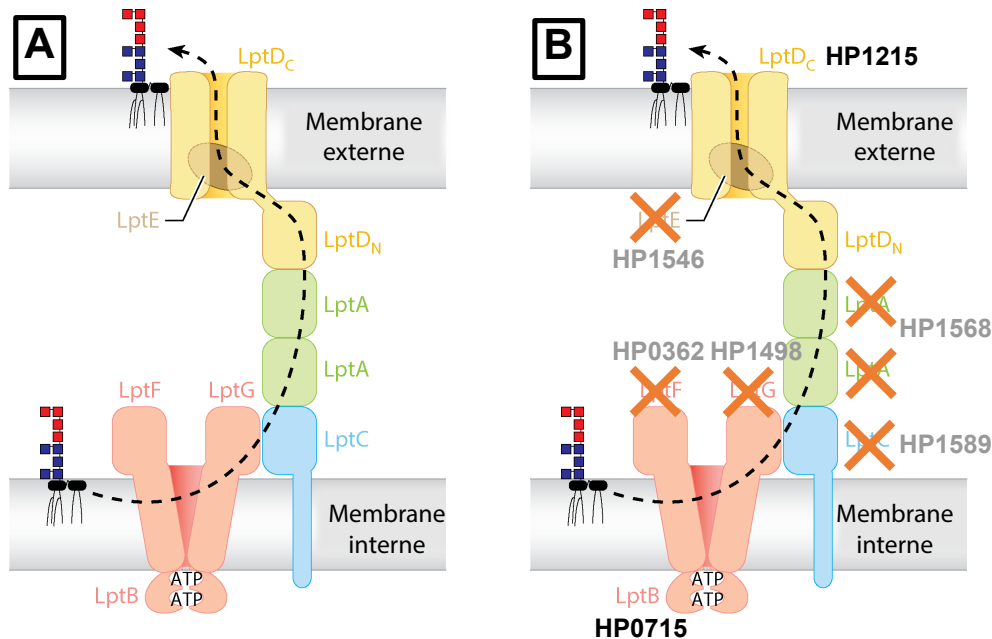


FIGURE 21: MODELISATION DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS L'EXPORT DU LPS VERS LA MEMBRANE EXTERNE.

A. CHEZ *E. COLI*. B. CHEZ HP, LES CROIX ROUGES REPRESENTENT LES ENZYMES AVEC UN TRES FAIBLE TAUX DE SIMILARITE AVEC *E. COLI*. (ADAPTE DE RUBIN¹¹⁹).

Une publication récente a permis de reconsidérer l'architecture préalablement définie du core OS et de l'antigène O de HP¹⁴². En effet, le core interne de HP était jusqu'à récemment limité à ces trois motifs Hep et le core externe contenait les motifs suivant jusqu'au DD-heptose (**Figure 22.a**). Les auteurs ont redéfini le LPS, en utilisant des techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN), indiquant que l'antigène O comprenait en réalité l'antigène O déjà décrit et la partie identifiée comme le core externe (**Figure 22.b**). Ils ont également mis en évidence des éléments essentiels du LPS dans la colonisation de l'estomac murin. En effet, leurs expériences de colonisation ont montré que les gènes *hp0479* (responsable de l'ajout d'un trio conservé GlcNAc, Fucose et D-D-heptose sur le core interne), *hp1284* (qui code pour la Hep III transférase) et *waal* (*hp1039*, responsable de la ligation de l'antigène O sur le lipide A) étaient essentiels à la colonisation par HP de l'estomac (**Figure 22.c**).

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 22: REDEFINITION DE LA STRUCTURE DU CORE OS ET DE L'ANTIGENE O.

D'APRES LI¹⁴². A. ANCIENNE STRUCTURE DECRITE DE L'ANTIGENE O, CORE EXTERNE ET INTERNE POUR LA SOUCHE HP 26695. B. REDEFINITION DE LA STRUCTURE DU LPS DE LA SOUCHE HP G27. C. ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DU LPS. LES ENZYMES ENCADREES EN ROUGE SONT ESSENTIELLES A LA COLONISATION DE HP DANS L'ESTOMAC MURIN.

II. 2. C. LE PEPTIDOGLYCANE (PGN)

II. 2. C. a. FONCTION ET STRUCTURE

La membrane externe et interne des bactéries à Gram négatif sont séparées par l'espace périplasmique. Il s'agit d'un compartiment cellulaire aqueux plus visqueux que le cytoplasme¹⁴³. C'est dans ce compartiment que se trouve un élément essentiel pour les bactéries : Le PGN.

Le PGN est une macromolécule hautement complexe et essentielle¹⁴⁴ de l'enveloppe bactérienne qui permet aux bactéries de résister aux différences de pression osmotique interne d'une part et externe, générée par l'environnement, d'autre part. C'est un composé dynamique et finement régulé, constamment remodelé et lié aux processus de croissance et de division cellulaire. Sa fonction principale est de conserver l'intégrité de la bactérie. En effet, l'inhibition de sa synthèse ou sa dégradation pendant la croissance bactérienne conduit à une rapide lyse cellulaire. Le PGN par sa structure rigide détermine également la forme de la bactérie. De plus, il sert d'ancrage à d'autres composants de l'enveloppe telles que des protéines¹⁴⁵ ou encore les acides téichoïques⁶⁷ des bactéries à Gram positif.

De façon générale, le PGN est constitué de longues chaînes de sucres (formant le squelette) alternant un résidu N-acétylmuramique (MurNAc) et un résidu GlcNAc reliés entre eux par une liaison osidique de type β -1 \rightarrow 4 et se terminant par un résidu de 1,6-anhydro-MurNAc chez les bactéries à Gram négatif. Le groupement D-lactoyl de chaque résidu MurNAc est substitué à un peptide constituant une chaîne d'acides aminés (généralement un pentapeptide). Ce pentapeptide se compose de façon générale, pour le PGN naissant, par les acides aminés suivants :

L-Alanine (Ala)- γ -D-glutamate-*meso*-2,6-diaminopimélate (A₂pm) (ou L-Lysine)-D-Ala-D-Ala, et le dernier acide aminé D-Ala peut être enlevé dans la macromolécule mature.

II. 2. C. b. BIOSYNTHESE DU PEPTIDOGLYCANE

Le processus de biosynthèse du PGN nécessite trois étapes. Dans un premier temps, au niveau **cytoplasmique**, on retrouve la formation des précurseurs nucléotidiques. Puis, au niveau de la **membrane cytoplasmique**, où ces intermédiaires se fixent au transporteur lipidique, C₅₅-P, permettant leurs **translocations** au travers de cette membrane. Et enfin, la **polymérisation et l'incorporation** du PGN nouvellement formé au sein du PGN préexistant.

II. 2. C. b. 1. ÉTAPES CYTOPLASMIQUES

Les deux précurseurs nucléotidiques sont l'**UDP-GlcNAc** et l'acide UDP-*N*-acétylmuramoyl-pentapeptide (**UDP-MurNAc-pentapeptide**).

Formation de L'UDP-GlcNAc

L'**UDP-GlcNAc** est synthétisé à partir du fructose-6-phosphate grâce à trois enzymes en quatre étapes : la glucosamine-6-phosphate synthase (**GlmS**), puis la phosphoglucosamine mutase (**GlmM**) et enfin la *N*-acétylglucosamine-1-phosphate uridylyltransférase (**GlmU**) (**Figure 23. A et B**).

GlmS catalyse la conversion du fructose-6-P en glucosamine-6-P de façon irréversible¹⁴⁶. Son homologue chez HP est **HP1532** et n'est pas supposé essentiel^{94,147}. Le domaine N-terminal de GlmS va permettre la fixation et l'hydrolyse de la L-glutamine en L-glutamate et ammoniac. Le domaine isomérase en C-terminal utilise ensuite l'ammoniac pour transformer le fructose-6-P en glucosamine-6-P¹⁴⁸. Ensuite, la glucosamine-6-P est transformée en glucosamine-1-P (GlcN-1-P) par l'enzyme essentielle **GlmM**¹⁴⁹. Cette enzyme n'est fonctionnelle que sous forme phosphorylée dimérique et le mécanisme dit en « ping pong » nécessite un intermédiaire catalytique, le N-glucosamine (GlcN)-1,6-di-phosphate. Cette enzyme apparait comme essentielle chez les bactéries à Gram négatif contrairement aux bactéries à Gram positif. Chez ce dernier type de bactéries, de nombreuses études montrent qu'elle n'est pas nécessaire à la viabilité mais en son absence, on observe une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques¹⁵⁰ ainsi qu'une diminution de la formation de biofilms¹⁵¹. Son homologue chez HP est **HP0075**. Le gène *hp0075* se situe en amont de l'opéron uréase contenant les gènes *ureAB* et a été annoté comme *ureC*, dans un premier temps.

Une étude¹⁴⁹ a montré que la protéine UreC est similaire à la protéine GlmM d'*E. coli* avec 43% d'identité. UreC est essentielle à la croissance de HP. De plus, on observe une totale complémentarité de GlmM d'*E. coli* par la surexpression sur un plasmide inducible de UreC de HP¹⁵². Au regard de cette dernière étude, la protéine UreC a été renommée GlmM chez HP.

Les deux dernières étapes sont catalysées par la même enzyme trimérique, **GlmU**, qui est une enzyme bi-fonctionnelle¹⁵³. Cette enzyme a été décrite en premier chez *B. subtilis*¹⁵⁴. Elle va, tout d'abord, avoir une fonction d'acétylase en transférant l'acétyl CoA sur la GlcN-1-P formant ainsi la GlcNAc-1-P, puis d'uridylyse¹⁵⁵ en transférant l'UTP sur la GlcNAc-1-P en présence de Mg²⁺ aboutissant à la formation de pyrophosphate inorganique (PPi) et d'**UDP-GlcNAc**. L'homologue de GlmU chez HP est **HP0683**.

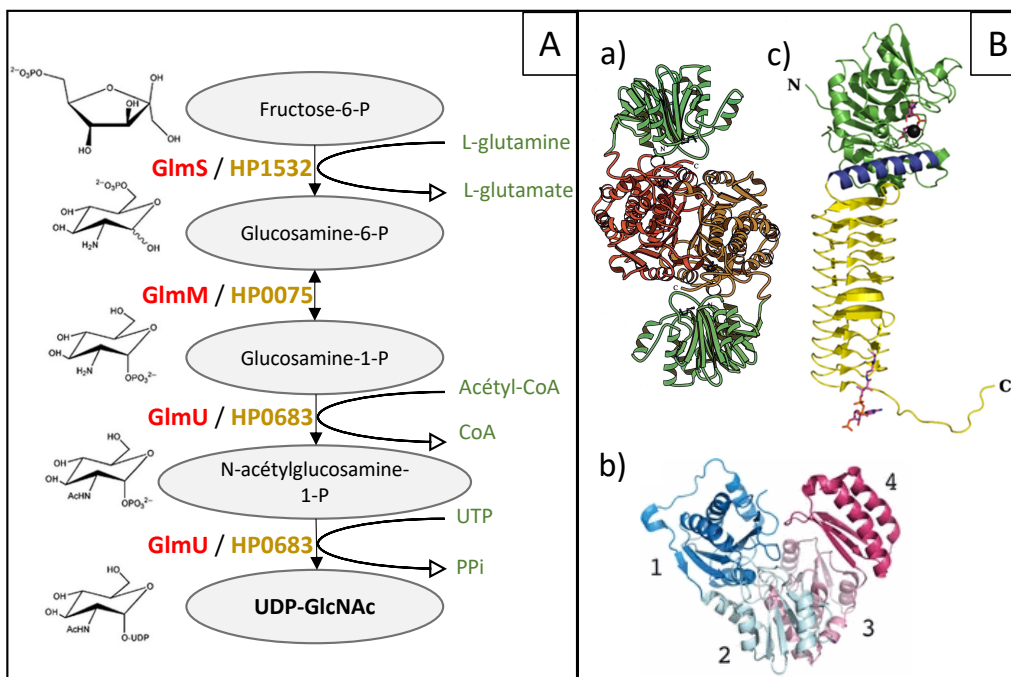


FIGURE 23: FORMATION DE L'UDP-GlcNAc.

A. LES QUATRE REACTIONS CONDUISANT A LA FORMATION DE L'UDP-GlcNAc¹⁵⁶. LES STRUCTURES DES INTERMÉDIAIRES REACTIONNELS SONT REPRÉSENTÉES A GAUCHE. LES ENZYMES EN ROUGES SONT CELLES D'*E. COLI* ET CELLES EN JAUNES DE HP. B. STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DES ENZYMES A) GLMS¹⁴⁸, B) GLMM¹⁵⁷ ET C) GLMU¹⁵⁶. A) DIMÈRE DE GLMS D'*E. COLI* AVEC LE DOMAINE GLUTAMINASE (EN VERT), ISOMÉRISE (EN ROUGE ET JAUNE). B) DIMÈRE DE GLMM DE *B. ANTHRACIS*. LES QUATRE DOMAINES DE LA PROTÉINE SONT NUMÉRÉS 1, EN BLEU, RÉSIDUS 1-152, 2, EN CYAN 153 A 256, 3, EN ROSE 257 A 369 ET 4 EN ROUGE 370 A 446. C) MONOMÈRE DE LA PROTÉINE GLMU. N ET C: EXTREMITÉ N- ET C-TERMINALE. DOMAINE ACÉTYLTRANSFÉRASE EST INDICÉ EN JAUNE ET URIDYLTRANSFÉRASE EN VERT ET L'HELICE α QUI RELIE LES DEUX DOMAINES (EN BLEU). LES PRODUITS CoA ET UDP-GlcNAc SONT COLORES EN MAGENTA. L'ION Co²⁺ COCRYSTALLISE AVEC GLMU EST MONTRE PAR UNE SPHERE NOIRE.

La formation de l'UDP-GlcNAc est cruciale dans la biosynthèse du PGN. Chez *E. coli*, les trois enzymes responsables de sa formation sont essentielles. Cependant, chez HP, comme décrit précédemment, GlmS n'apparaît pas essentielle avec l'insertion de quinze transposons dans le gène *glmS* d'après l'étude N. Salama. La non-essentialité de ce gène soulève de nombreuses questions :

D'où provient le GlcNAc nécessaire à la biosynthèse du PGN en absence de GlmS ? La bactérie HP est-elle capable d'importer du GlcNAc exogène ? Si oui, par quels mécanismes et quels enzymes sont impliquées dans cette voie ?

Formation de L'UDP-MurNAc-pentapeptide

La synthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide peut se diviser en deux phases distinctes. La première va être la formation de l'UDP-MurNAc (Figure 24) puis l'ajout du pentapeptide pour former l'UDP-MurNAc-pentapeptide (Figure 25).

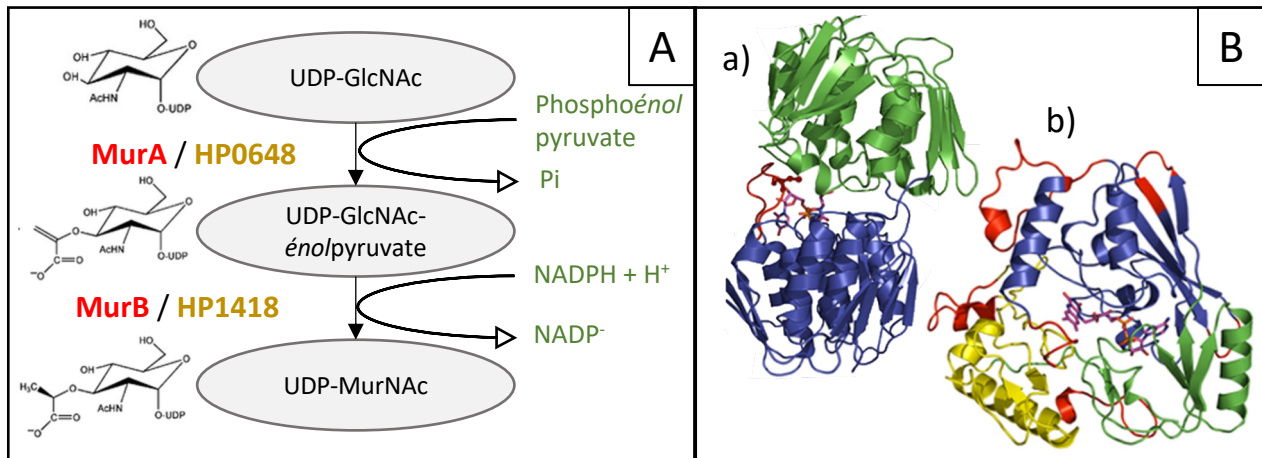


FIGURE 24: FORMATION DE L'UDP-MURNAc.

D'APRES BARRETEAU¹⁵⁶. A. LES DEUX REACTIONS CONDUISANT A LA FORMATION DE L'UDP-MURNAc. LES STRUCTURES DES INTERMEDIARIES REACTIONNELS SONT REPRESENTÉES A GAUCHE. LES ENZYMES EN ROUGES SONT CELLES D'*E. COLI* ET CELLES EN JAUNES DE HP. B. STRUCTURE 3D DE : a) MURa D'*E. COLI* COMPLEXE AVEC L'UDP-GlcNAc ET LA FOSFOMYCINE. LES DEUX DOMAINES SONT INDICUES EN BLEU ET VERT. LA BOUCLE FLEXIBLE IMPLIQUÉE DANS LE RAPPROCHEMENT DES DEUX DOMAINES DE LA PROLINE 112 A LA PROLINE 121 EST EN ROUGE. L'UDP-GlcNAc EST EN MAGENTA. ET b) MURB D'*E. COLI* (TYPE I). LES TROIS DOMAINES SONT INDICUES EN JAUNE, BLEU ET VERT. LE FAD EST EN MAGENTA. LES STRUCTURES EN ROUGE CORRESPONDENT AUX STRUCTURES ABSENTES DE MURa DE TYPE II COMME POUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Deux enzymes interviennent dans la première phase, les UDP-N-acetylglucosamine-1-carboxyvinyltransferase (Mur) A et B, avec pour substrat de départ, le précurseur précédemment décrit, l'UDP-GlcNAc. La transférase **MurA** catalyse le transfert du groupement *énol*pyruvate du phospho*énol*pyruvate sur le groupement hydroxyle en position 3 de l'UDP-GlcNAc formant ainsi l'UDP-GlcNAc-*énol*pyruvate. En absence de ligand, la protéine MurA laisse apparaître deux domaines bien distincts. En présence de son ligand, la protéine change de conformation dans une position dite « fermée » où les deux domaines se rapprochent. La boucle, flexible, identifiée à l'origine de ce changement de conformation est définie entre deux prolines, de la position 112 à 121. Cette enzyme est la cible de la fosfomycine¹⁵⁸. En effet, cet antibiotique possède une structure très similaire au phospho*énol*pyruvate et est capable par une alkylation du site actif de MurA au niveau de la cystéine en position 115, d'inhiber de façon irréversible l'action de MurA. L'homologue de MurA chez HP est **HP0648**.

La flavoprotéine **MurB** va permettre de former l'UDP-MurNAc en réduisant le groupement *énol*pyruvate de l'UDP-GlcNAc-*énol*pyruvate. La réaction catalysée par MurB implique deux demi-réactions en suivant un mécanisme de ping pong bi-bi¹⁵⁹, dans lequel la Flavine adénine dinucléotide (FAD) sert de cofacteur à la réaction d'oxydo-réduction. La première demi-réaction est la réduction du FAD en FADH₂ par le transfert de deux électrons provenant du NADPH. Les deux électrons du FADH₂ formé vont servir pour la deuxième demi-réaction, et vont être transférés sur le carbone 3 du groupement *énol*pyruvate¹⁶⁰. C'est cette étape qui va générer un groupement lactoyl sur lequel va pouvoir se fixer le pentapeptide. L'homologue de MurB chez HP est **HP1418**.

L'ajout du pentapeptide sur le groupement lactoyl de l'UDP-MurNAc est catalysé successivement par quatre enzymes appelées les Mur ligases. Ces enzymes ajoutent une L-Ala par **MurC**, un D-acide glutamique (D-Glu) par **MurD**, un diamino acide qui est généralement l'acide *meso*A₂pm (*meso*-DAP) chez les bactéries à Gram négatif ou la L-Lysine (L-lys) chez les bactéries à Gram positif par **MurE** et un dipeptide D-Ala-D-Ala par **MurF**¹⁶¹. La variabilité de ces acides aminés au sein des espèces bactériennes sera développée dans le **Chapitre II. 2. C. c.** Les Mur ligases sont des enzymes essentielles pour la viabilité bactérienne qui catalyse la formation d'un pont peptidique

ou aminé avec la formation simultanée d'adénosine di-phosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) à partir de l'ATP. Il est important de noter que la réaction requiert la présence d'un cation divalent tel que Mg^{2+} ou le Mn^{2+} . Elles possèdent le même mécanisme de réaction qui consiste en l'activation du groupement carboxyle du précurseur UDP-MurNAc par l'ATP formant ainsi un intermédiaire réactionnel qu'est le phosphate acylé et de l'ADP. Ensuite, un intermédiaire tétraédrique est généré par l'attaque du groupement amine de l'acide aminé ou du peptide sur ce phosphate acylé et après élimination du Pi, il y a formation de la liaison peptidique¹⁶². De plus, de nombreuses études de cristallographie ont permis de montrer que les Mur ligases possèdent la même structure 3D avec trois domaines. Le domaine N-terminal est impliqué dans la liaison de l'UDP-MurNAc, la partie centrale, dans la liaison avec l'ATP et le domaine C-terminal, dans la liaison avec l'acide aminé ou le dipeptide¹⁶³. Les deux domaines, central et C-terminal, sont similaires parmi les différentes Mur ligases. Cependant, le domaine N-terminal montre une certaine diversité structurale et de séquence qui permet de diviser en deux groupes ces enzymes, MurC et D d'une part et Mur E et F d'autre part. Au sein de ce domaine, MurC et MurD partagent un même repliement α/β de type « Rossmann » qui diffère du repliement des enzymes MurE et MurF. Ceci est probablement dû au fait que les enzymes MurE et MurF ont un substrat d'une taille plus importante que les deux premières. Chez *E. coli*, ces quatre Mur ligases sont essentielles. Chez HP, MurC, MurD et MurE le sont également. Deux études génomiques divergent sur l'essentialité du gène *murF*. L'étude de N. Salama⁹⁴ servant à invalider les différents gènes de HP en insérant de façon aléatoire un transposon mariner à montrer la présence de ce transposon au sein du gène *murF* (*hp0740*). Un autre étude du même type¹⁴⁷ a montré, *a contrario*, l'essentialité du gène *murF*. Il est difficile d'envisager que ce gène ne soit pas essentiel. Cela impliquerait la présence uniquement de tripeptides, et une polymérisation du PGN (décrite plus loin) à partir de ces tripeptides, ce qui n'est pas le cas. Il est plus probable que l'unique transposon se soit inséré dans une partie du gène qui n'impacte pas sur la fonctionnalité de la protéine.

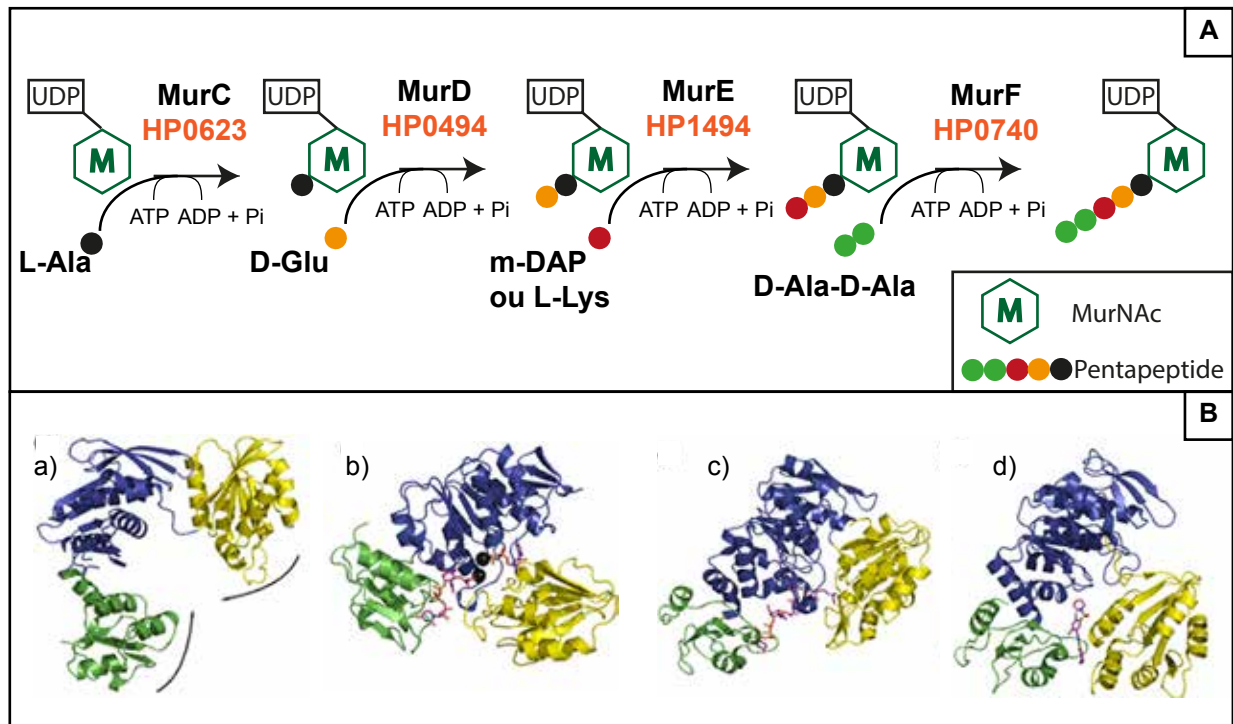


FIGURE 25: FORMATION DE L'UDP-MURNAC-PENTAPEPTIDE.

A. ÉTAPES REACTIONNELLES ABOUTISSANT A LA FORMATION DE L'UDP-MURNAC-PENTAPEPTIDE CATALYSEES PAR LES ENZYMES MURC, MURD, MURÉ ET MURF. LES NOMS DES ENZYMES ANNOTES EN ORANGE SONT LES HOMOLOGUES CHEZ HP. **B.** STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DES MUR LIGASES¹⁵⁶ **a)** MURC, STRUCTURE OUVERTE ET SANS LIGAND DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*; **b)** MURD, STRUCTURE FERMÉE COMPLEXÉE AVEC L'UDP-MURNAC-L-ALA, ADP ET Mg^{2+} DE *E. COLI*; **c)** MURÉ, STRUCTURE FERMÉE COMPLEXÉE AVEC L'UDP-MURNAC-L-ALA- γ -D-GLU-MESO-DAP D'*E. COLI*; **d)** MURF, STRUCTURE FERMÉE COMPLEXÉE AVEC SON INHIBITEUR, LA SULFONAMIDE DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*. LES DOMAINES N-TERMINAL, CENTRAL ET C-TERMINAL SONT INDUQUÉS EN VERT, BLEU ET JAUNE RESPECTIVEMENT. LES LIGANDS SONT COLORES EN MAGENTA. LES IONS Mg^{2+} SONT REPRÉSENTÉS PAR DES SPHÈRES NOIRES.

Formation des précurseurs des acides aminés du pentapeptide

Le D-Glu (Figure 23. Réaction 1)

Deux enzymes sont impliquées dans la biosynthèse du D-Glu : La glutamate racémase (**MurI**) et la D-acide-aminé aminotransférase (D-AAT). MurI¹⁶⁴ est une enzyme essentielle chez *E. coli* qui catalyse l'interconversion des énantiomères D- et L- du glutamate. Chez *E. coli*, MurI a besoin de l'UDP-MurNac-L-Ala comme précurseur pour être activée¹⁶⁵ et la formation du D-Glu est régulée par ce même précurseur s'adaptant ainsi aux besoins de la bactérie¹⁶⁶. Chez *E. coli*, MurI est retrouvée sous forme monomérique en solution contrairement à HP où cette enzyme, dont l'homologue est **HP0549**, est retrouvée sous forme dimérique¹⁶⁷. De plus, chez HP, MurI n'est pas

dépendante de la concentration en précurseur UDP-MurNac-L-Ala pour être activée. Murl qui n'est pas essentielle chez HP⁹⁴, est composée de deux domaines. Le domaine A du côté N-terminal contient les acides aminés conservés impliqués dans la déprotonation du D-Glu contrairement au domaine B du côté C-terminal qui contient les résidus catalytiques impliqués dans la déprotonation du L-Glu.

L'enzyme D-AAT catalyse la formation du D-Glu et du pyruvate à partir de D-Ala et d' α -cétogutarate¹⁶⁸. Certaines bactéries telles *B. subtilis*¹⁶⁹ possèdent les deux voies de synthèse du D-Glu contrairement à *E. coli* ou encore HP qui ne possèdent que Murl pour générer du D-Glu.

Le meso-DAP (Figure 23. Réaction 2)

La voie de biosynthèse conduisant à la production de Lys et de meso-DAP chez les bactéries est connue sous le nom de la voie DAP¹⁷⁰. La première étape implique la conversion de l'aspartate (Asp) en aspartyl phosphate grâce à l'aspartokinase ou LysC (**HP1229**) suivie de sa réduction en Asp semi-aldehyde (ASA) catalysé par l'ASA déhydrogénase ou Asd (**HP1189**). Ces étapes sont communes à la voie de biosynthèse de la Lys, de la thréonine (Thr), de l'isoleucine (Ile) et de la méthionine (Met). L'étape suivante est la conversion de l'ASA et du pyruvate en dihydrodipicolinate (DHDP) catalysée par la DHDP synthase (DHDPS ou DapA) (**HP1013**). Le DHDP est ensuite réduit en tétrahydrodipicolinate (THDP) par la DHDP réductase (DHDPR ou DapB) (**HP0510**). La plupart des bactéries utilisent ensuite la voie succinylase, comme *E. coli* ou HP qui convertie le THDP en N-succinyl-2-amino-6-cétopimélate grâce à l'enzyme N-succinyl-transférase ou DapD (**HP0626**). Cependant, certaines bactéries, par exemple, *B. subtilis*, utilisent plutôt la voie acétylase en incorporant un groupement N-acétyl au lieu d'un groupement N-succinyl. Alternativement, certaines bactéries comme *Corynebacterium glutamicum* sont capables de convertir le THDP directement en meso-DAP grâce à la meso-DAP déhydrogénase. Ensuite, le N-succinyl-2-amino-6-cétopimélate est converti en N-succinyl-L,L-DAP par une aminotransférase. Celui-ci va alors subir une déacétylation puis une épimérisation par la DAP déacétylase ou DapE (**HP0212**) et la DAP

épimérase ou DapF (**HP0566**) respectivement pour former le **meso-DAP**. Ce dernier peut alors subir une dernière modification par la DAP décarboxylase ou LysA (**HP0290**) formant ainsi de la Lys.

Le dipeptide D-Ala-D-Ala (Figure 23. Réaction 3)

Le D-Ala est essentiellement retrouvé au sein du PGN mais il est également présent dans les acides lipotéchoïques/téchoïques des bactéries à Gram positif. Le D-Ala est produit à partir du L-Ala grâce l'enzyme **alanine racémase**. On retrouve parmi les bactéries, une seule enzyme de ce type mais parfois certaines en possèdent deux, comme c'est le cas chez *E. coli*¹⁷¹ ou *P. aeruginosa*¹⁷² codées par deux gènes *alr* et *dadX*. L'expression du gène *alr* est constitutive et suffisante pour maintenir une croissance bactérienne normale¹⁵⁶. L'expression du gène *dadX* est inductible et requise uniquement lorsque le L-Ala est utilisé comme source de carbone et d'énergie. Contrairement à *E. coli*, dont la protéine Alr est présente sous forme de dimère, la protéine Alr (**HP0941**) de HP a été décrite comme un monomère¹⁷³.

Ensuite, deux molécules de D-Ala vont se condenser pour former le dipeptide D-Ala-D-Ala grâce à une ligase dépendante de l'ATP D-Ala:D-Ala ligase (**Ddl**). Le site de liaison au niveau du domaine N-terminal de Ddl (site donneur) est hautement spécifique contrairement au site de liaison du domaine C-terminal (site accepteur) qui est moins spécifique et qui peut donc accepter différents acides aminés de conformation D. Deux gènes chez *E. coli*, *ddlA* et *ddlB* ont été décrit et seul un homologue de *ddlA* (**hp0738**) a été retrouvé chez HP.

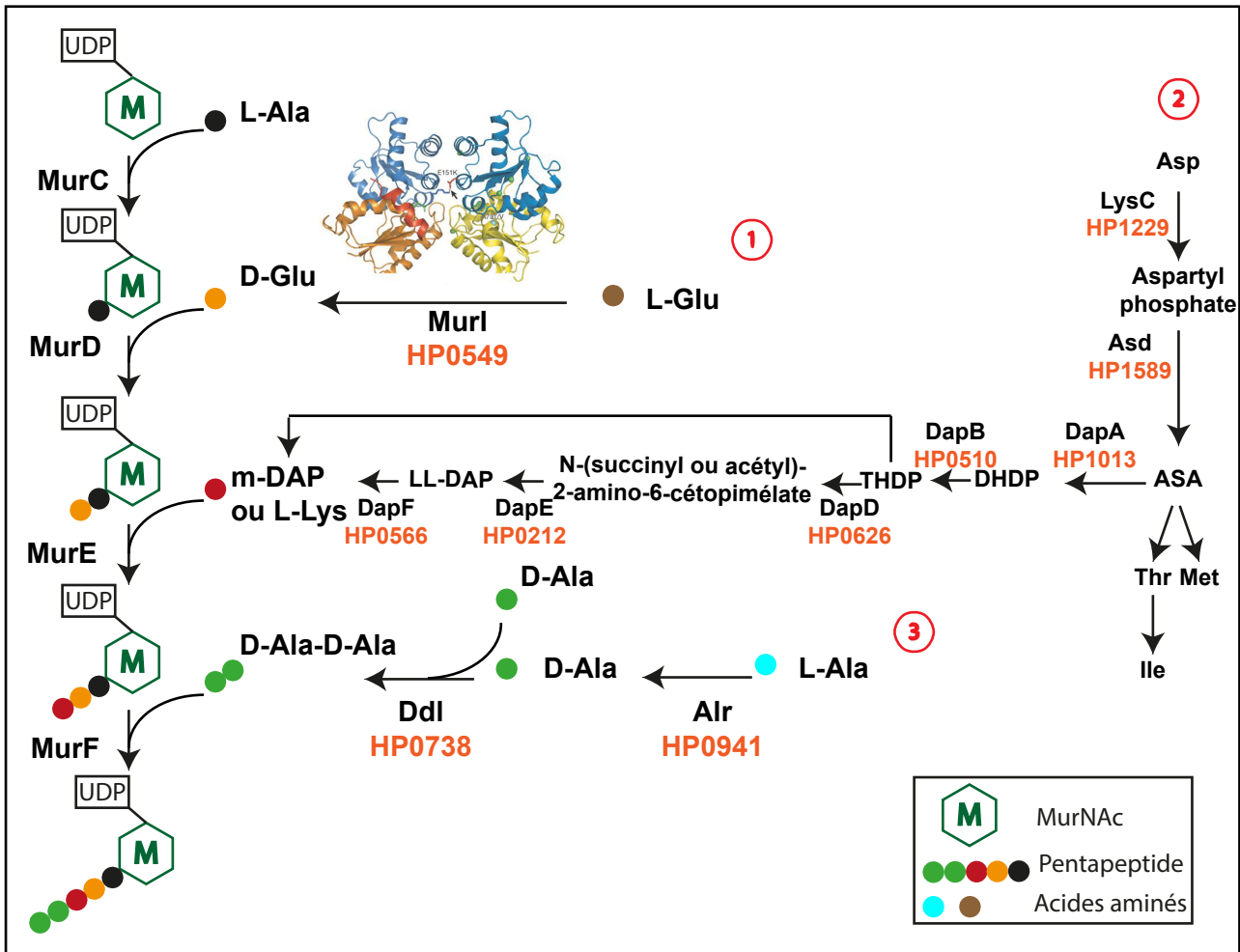


FIGURE 26: FORMATION DES PRECURSEURS DU PENTAPEPTIDE.

1. FORMATION DU D-GLU ; 2. FORMATION DU *MESO*-DAP ; 3. FORMATION DU DIPEPTIDE D-ALA-D-ALA. LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE¹⁶⁷ INDIQUEE SUR CETTE FIGURE CORRESPOND AU DIMERE DE MURI D'HP CONTENANT LE D-GLU (EN VERT) AVEC LES MONOMERES A (DOMAINE N-TERMINAL EN JAUNE ET ORANGE) ET B (DOMAINE C-TERMINAL EN BLEU) ET L'HELICE EN C-TERMINAL (EN ROUGE) DANS LE MONOMERE DE GAUCHE.

II. 2. C. b. 2. ÉTAPES MEMBRANAIRES

Les étapes membranaires vont permettre de former les intermédiaires lipidiques nécessaires à la biosynthèse du PGN. Ceci va s'effectuer en deux étapes : La formation du lipide et la formation du lipide II

La formation du lipide I

Pour se fixer à la membrane, l'UDP-MurNAc-pentapeptide précédemment formé dans le cytoplasme va se lier au transporteur lipidique, C₅₅-P. C'est la protéine intégrale de membrane, **MraY**^{174,175} qui va effectuer ce transfert et permettre la formation de l'undécaprényl-pyrophosphate-MurNAc-pentapeptide (**Lipide I**) en libérant de l'UMP. Cette réaction nécessite la présence d'ion Mg²⁺. MraY est une protéine essentielle constituée de dix hélices transmembranaires, cinq domaines cytoplasmiques hydrophiles (I à V) et six domaines périplasmiques hydrophiles (P1 à P6). Les deux extrémités N- et C-terminales sont situées du côté périplasmique. Une étude a confirmé ces prédictions en cristallisant la protéine MraY d'*Aquifex aeolicus*¹⁷⁶. Cette enzyme appartient à la super famille des polyprényl-phosphate N-acétyl hexosamine 1-phosphate transférase (PNPT) qui inclut la protéine WecA décrite précédemment, impliquée dans la biosynthèse de l'antigène O. Chez *E. coli*, le pool de lipide I est estimé à 700 molécules par cellule¹⁷⁷. Cette quantité très faible de lipide I peut s'expliquer par le caractère transitoire de cette molécule qui va rapidement être converti en lipide II. L'homologue de MraY chez HP est **HP0493**. De façon étonnante, cette enzyme ne semble pas essentielle chez HP^{94,147}. Chez HP, WecA et MraY sont annotées comme non essentielles et appartiennent à la même famille de protéines. Elles sont impliquées toutes deux dans la biosynthèse de la paroi et catalysent le transfert d'un sucre phosphorylé sur un polyprényl-phosphate en une seule réaction sans formation d'un intermédiaire covalent. Ces deux enzymes étant très proches, on pourrait donc émettre l'hypothèse qu'elles puissent catalyser les mêmes réactions chimiques. Une étude récente de 2016¹⁷⁸ a testé cette hypothèse en testant différents substrats pour chaque enzyme. L'activité de MraY a été testée avec plusieurs précurseurs de la synthèse du PGN, l'UDP-MurNAc, l'UDP-MurNAc-L-Ala, l'UDP-MurNAc-dipeptide, l'UDP-MurNAc-tripeptide et l'UDP-MurNAc-pentapeptide et tous se sont

révélés être des substrats de *MraY* avec des activités relatives plus ou moins importantes. Cependant, l'activité mesurée avec l'UDP-GlcNAc (substrat de *WecA*) est nulle. *MraY* semble donc spécifique de son substrat physiologique. A l'inverse, cette même étude a testé l'UDP-galactose, l'UDP-GalNAc, le GDP-glucose, l'ADP-ribose, l'UDP-glucuronic acid, le GDP-d-mannose et l'UDP-hexanolamine comme substrats et aucune activité de *WecA* n'a pu être mesurée. Une autre étude a mesuré l'activité de *WecA* en présence d'autres substrats et notamment avec l'UDP-MurNAc-pentapeptide (substrat de *MraY*). Aucune activité n'a pu être mesurée pour ce substrat. *WecA* apparaît donc être hautement spécifique pour l'UDP-GlcNAc¹⁷⁹, son substrat physiologique. Les enzymes *WecA* et *MraY*, aussi proches qu'elles puissent l'être, ne semblent capables d'intervenir que sur leurs substrats réactionnels respectifs. Ainsi, reste ouverte la question de la non essentialité de *MraY* chez HP.

La formation du lipide II

La glycotransférase essentielle **MurG**^{180,181} catalyse ensuite la condensation du GlcNAc sur le lipide I à partir de l'UDP-GlcNAc libérant de l'UDP. Cette condensation va aboutir à la formation d'une liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ entre le GlcNAc et le MurNAc. Il a été montré que cette protéine interagissait avec les protéines *MraY* et *MreB* en deux complexes suggérant son implication dans les processus d'élongation cellulaire^{182,183}. *MurG* apparaît également être distribuée de façon aléatoire au sein de l'enveloppe et particulièrement au niveau des sites de division bactériens. De plus, la position de *MurG* requiert la présence de *PBP3* et *FtsQ*. La structure de *MurG* montre deux domaines bien distincts séparés par une fente profonde qui contient le site actif. Le domaine N est composé de sept feuillets β parallèles et six hélices α . Le domaine C est composé de six feuillets β parallèles et huit hélices α . On estime à environ 1000 à 2000 molécules de lipide II par cellule chez *E. coli*¹⁷⁷. L'homologue chez HP de la protéine *MurG* est **HP1155** et ne semble pas être essentiel^{94,147}. Cette étape étant essentielle pour la biosynthèse du PGN : **Chez HP, quelle est l'enzyme capable d'assurer le transfert de l'UDP-GlcNAc sur le lipide II en absence de MurG ?** Une équipe canadienne a identifié la potentielle enzyme responsable de cette réaction enzymatique, l'hydrolase *PseG* (**HP0326**). Cette enzyme a été décrite comme catalysant la quatrième étape de la biosynthèse de

l'acide pseudaminique à partir de l'UDP-GlcNAc. HP est capable de glycosyler sa flagelline grâce à cet acide pseudaminique¹⁸⁴. La structure cristallographique de PseG de *C. jejuni* a été résolue¹⁸⁵ révélant des similarités avec les protéines de la famille M28 des glycotransférases et en particulier, MurG d'*E. coli*. Même si l'homologie entre ces deux protéines est faible¹⁸⁶ (<15% d'identité), tous les résidus conservés importants pour la liaison avec le GlcNAc sont présents et s'alignent avec ceux de MurG d'*E. coli*. Même si cette hypothèse reste à prouver, la pertinence de l'étude de PseG en tant que glycosyltransférase du GlcNAc sur le lipide II en absence de MurG est importante.

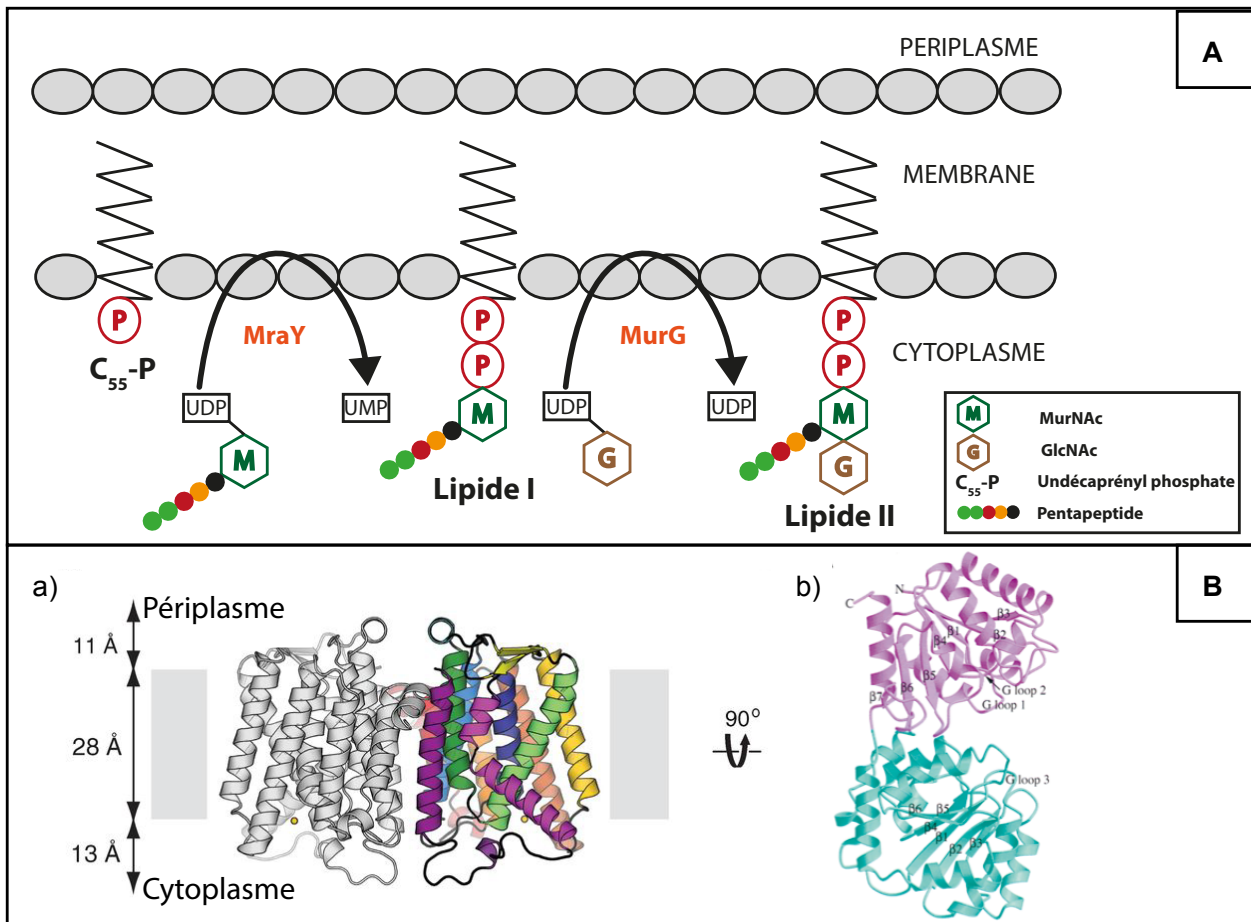


FIGURE 27: FORMATION DES PRECURSEURS LIPIDIQUES.

A. SCHEMA DES REACTIONS ABOUTISSANT A LA FORMATION DU LIPIDE II PAR DEUX REACTIONS ENZYMATIQUES CATALYSEES PAR MRAY ET MURG. B. STRUCTURE EN 3D DES PROTEINES : A) MRAY¹⁷⁶ SOUS FORME DIMERIQUE DE *AQUIFEX AEOLICUS*. SEULEMENT LES HELICES (DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES) D'UN MONOMERE SONT COLOREES. LA SPHERE JAUNE REPRESENTE L'ION Mg^{2+} . ET B) MURG¹⁸⁷. LE DOMAINE N EST EN VIOLET ET LE DOMAINE C EN VERT.

Pour que la biosynthèse du PGN se poursuive, le lipide II doit ensuite passer au travers de la membrane cytoplasmique pour que celui subisse les étapes de polymérisation qui ont lieu dans le périplasme.

II. 2. C. b. 3. TRANSLOCATION DU LIPIDE II

Cette étape de la biosynthèse du PGN reste encore aujourd'hui sujet à controverse dans la communauté scientifique. Dans un premier temps, la diffusion passive du lipide II au travers de la membrane cytoplasmique avait été envisagée¹⁸⁸ mais réfutée en 2007 lorsqu'une équipe décrit que la translocation du lipide II nécessite une source d'énergie via l'hydrolyse d'ATP¹⁸⁹. Cette publication a permis d'envisager par la suite diverses protéines intégrales de membranes pouvant remplir cette fonction de flippase. Le débat est centré sur deux protéines particulières FtsW et MurJ.

Les premiers candidats suggérés étaient FtsW et RodA. Le gène *ftsW* fait partie de l'opéron requis pour la biosynthèse du PGN et la déplétion de la protéine FtsW entraîne un phénotype de bactéries filamenteuses résultat d'une absence de division cellulaire chez *E. coli*¹⁹⁰. FtsW est localisé dans le septum bactérien et recrute une transpeptidase essentielle PBP3¹⁹¹. C'est une protéine essentielle polytopique membranaire composée de dix segments transmembranaires et impliquée dans la division bactérienne. Elle possède une très forte similarité avec les protéines RodA (impliquées dans le maintien de la forme bactérienne) et SpoVE (impliquées dans la sporulation des bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*). Ces trois protéines appartiennent à la famille des « *shape, elongation, division and sporulation* » (SEDS). Depuis cette hypothèse, aucune publication n'a permis de démontrer l'implication de RodA en tant que flippase du lipide II. De plus, récemment, la structure de RodA de *Thermus thermophilus*¹⁹² a été résolue montrant une absence de canal transmembranaire requis pour le transport du lipide II et aucune similarité structurale avec des transporteurs ou des flippases. Cette dernière étude semble exclure RodA comme potentielle flippase du lipide II. En 2011, une équipe¹⁹³ met en évidence, par des expériences *in vitro*, dans des protéoliposomes ainsi que dans des vésicules membranaires surexprimant FtsW, l'implication de cette protéine comme flippase du lipide II. Cependant, aucune étude n'a, à ce jour montrer cette activité *in vivo*.

MurJ est également une protéine intégrale de membrane qui possède quatorze segments transmembranaires appartenant à la famille des « *multidrug, oligosaccharidyl-lipid, polysaccharide* » (MOP). MurJ est essentielle pour la viabilité cellulaire et pour le maintien de la morphologie bactérienne. Lorsque MurJ est déplétée, on observe une diminution de la biosynthèse du PGN ainsi qu'une accumulation des précurseurs lipidiques dans le cytoplasme chez *E. coli*¹⁹⁴. Une étude de 2014 a permis de mettre en évidence le rôle de MurJ *in vivo*. En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que le lipide II n'était plus dégradé par la colicine M lorsque MurJ était inactivée laissant supposer son rôle dans la translocation du lipide II¹⁹⁵. *A contrario*, les auteurs n'ont observé aucun effet en réalisant la même expérience avec la protéine FtsW. Cependant, dans l'étude précédente, montrant le rôle *in vitro* de FtsW, la même expérience a été réalisée avec la protéine MurJ et n'a pas montré son rôle dans le transport du lipide II *in vitro*¹⁹³. Contrairement à *ftsW*, le gène *murJ* est localisé loin des autres gènes impliqués dans la biosynthèse du PGN. De plus, l'homologue de MurJ chez *B. subtilis* n'est pas essentiel¹⁹⁶. Chez cette bactérie, une autre protéine AmJ permet de compléter le phénotype de létalité dans une souche d'*E. coli* déplétée pour MurJ. Il a également été montré que l'inactivation des gènes *amJ* et *murJ* chez *B. subtilis* étaient létale pour la bactérie. MurJ et AmJ auraient donc une fonction redondante dans cette bactérie¹⁹⁷.

Chez HP, MurJ (**HP0885**), n'est pas essentielle¹⁹⁸. Une étude de 2016¹⁹⁹, a décrit chez HP comme chez *B. subtilis*, la présence d'autre protéine qui est redondante avec MurJ pour la viabilité cellulaire. Il s'agit de la protéine Wzk, dont le rôle a été décrit précédemment, et qui est impliquée dans la translocation de l'antigène O au travers de la membrane cytoplasmique. En effet, l'expression hétérologue de cette protéine dans une souche d'*E. coli* déplétée pour la protéine MurJ permet de restaurer le phénotype de létalité. De plus, MurJ chez HP devient essentielle en absence de Wzk suggérant que les deux protéines MurJ et Wzk transportent le lipide II au travers de la membrane chez HP. Notons que FtsW (HP1560) n'est également pas essentielle chez HP, il serait donc intéressant de voir si : (i) un double mutant *wzk ftsW* est létal pour la bactérie et (ii) comme pour MurJ, si Wzk est capable de compléter la létalité observée dans un mutant *ftsW* chez *E. coli*.

Aujourd'hui, au regard des données présentes dans la littérature scientifique, il nous est impossible de définir avec certitude quelle flippase est responsable de la translocation du lipide II dans la biosynthèse du PGN. Cette question reste un sujet d'actualité chez les différents acteurs de cette controverse et animera encore le domaine de la paroi bactérienne avant d'obtenir une réponse.

II. 2. C. b. 4. POLYMERISATION ET INCORPORATION DU PGN NEOFORME

Les étapes finales de polymérisation et de réticulation sont assurées dans le périplasme par les PBPs. Les brins de glycanes naissant sont dans un premier temps polymérisés par la fonction glycosyltransférase (GTase) des PBPs en utilisant le précurseur lipide II comme substrat²⁰⁰. Ensuite, les brins sont liés avec le PGN préexistant grâce à la fonction transpeptidase (TPase) des PBPs. On distingue deux classes de PBPs : Celles de hauts poids moléculaires (les HMM) et celles de bas poids moléculaires (les LMM). Les HMM sont responsables de la polymérisation du PGN ainsi que de l'insertion du PGN néoformé au PGN préexistant²⁰¹. Ce sont des enzymes bi-fonctionnelles. L'activité de leur domaine C-terminal est la même entre les HMM et correspond à une activité D,D-TPase catalysant le pont entre deux peptides de brins adjacents. C'est le domaine N-terminal qui permet de distinguer deux classes parmi les HMM. En effet, ce domaine possède soit une activité de **GTase** (PBPs de **classe A**) qui permet l'élongation de la chaîne de glycane, soit un rôle dans la **morphogénèse** (PBPs de **classe B**)¹⁸². Les LMM sont monofonctionnelles et correspondent soit à des D,D-carboxypeptidases (**CPases**), soit à des endopeptidases (**EPases**) ou encore des β -lactamases de classe C.

E. coli possède douze PBPs, trois appartenant à la classe A (PBP1a, PBP1b et PBP1c), deux à la classe B (PBP2 et PBP3) et sept de LMM (classe C). PBP1a et PBP1b sont les deux principales TPases -GTases. Cependant aucune de ces deux enzymes n'est essentielle, seul une invalidation des deux gènes *pbp1a* et *pbp1b* est létale pour la bactérie²⁰². PBP2 est impliquée dans l'élongation bactérienne et PBP3 est la principale protéine du complexe appelée le « divisome », impliquée donc dans la division bactérienne. PBP4 et 7 sont deux EPases qui hydrolysent le pont peptidique formé entre deux brins²⁰³. PBP5 (la principale) et PBP6 sont les CPases qui hydrolysent le dipeptide

terminal D-ala-D-ala²⁰⁴. Le nombre de PBPs présent entre les espèces bactériennes diffèrent. Par exemple, chez les bactéries à Gram positif, on retrouve seize PBPs chez *B. subtilis*²⁰⁵, six chez *Listeria monocytogenes*²⁰⁶ ou *Streptococcus pneumoniae*^{207,208}.

HP ne possède que trois PBPs, une de classe A, PBP1 (**HP0597**), homologue à la PBP1a de *E. coli* et deux de classe B, PBP2 (**HP1565**) et PBP3 (**HP1556**)²⁰⁹. Ces trois enzymes sont essentielles. La déplétion de PBP1 ou PBP2 conduit à un arrêt de la croissance au bout de deux à trois temps de générations et à une conversion en forme cocoïde prématurée. La déplétion de PBP1 (**Figure 28.A.**) conduit à un bourgeonnement de la bactérie sous forme cocoïde à partir du septum de division et pour celle de PBP2 (**Figure 28.B.**), les bactéries s'élargissent progressivement jusqu'à ce que les cellules deviennent rondes ou cocoïdes. La déplétion de PBP3 (**Figure 28.C.**) n'a pas d'impact sur la croissance bactérienne mais elle est incapable de former les septums bactériens nécessaires à la division cellulaire entraînant alors un phénotype de filamentation²¹⁰.

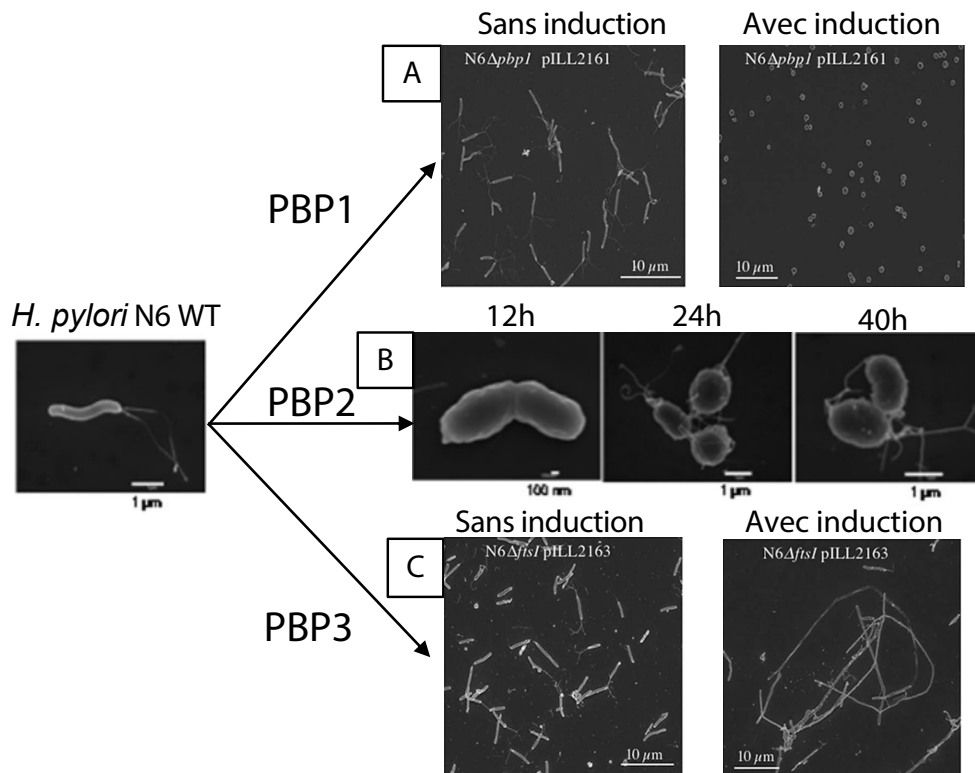


FIGURE 28: PHENOTYPES OBSERVES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE LIES A LA DEPLETION DE A. PBP1 ; B. PBP2 ; C. PBP3.

A. ET C. D'APRES BONECA IG²¹⁰ ET B. D'APRES EL GHACHI M²¹¹

D'autres PBP ont été décrites dans la littérature. Cependant, après plusieurs années de controverse, et surtout après le séquençage du premier génome de HP, la présence d'uniquement trois PBPs HMM a été confirmée.

Comme chez d'autres bactéries déjà décrites, les PBPs d'HP interagissent également avec des protéines du *divisome* ou de l'*élongasome*. La structure montrant l'interaction entre PBP2 et MreC (protéine de l'*élongasome*) a été résolue à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble dans le laboratoire d'Andrea Dessen²¹² en collaboration avec le laboratoire. Cette étude a montré que MreC interagit avec PBP2 par l'insertion du domaine β C-terminal entre les régions de la tête et de l'ancre de PBP2 (**Figure 29**).

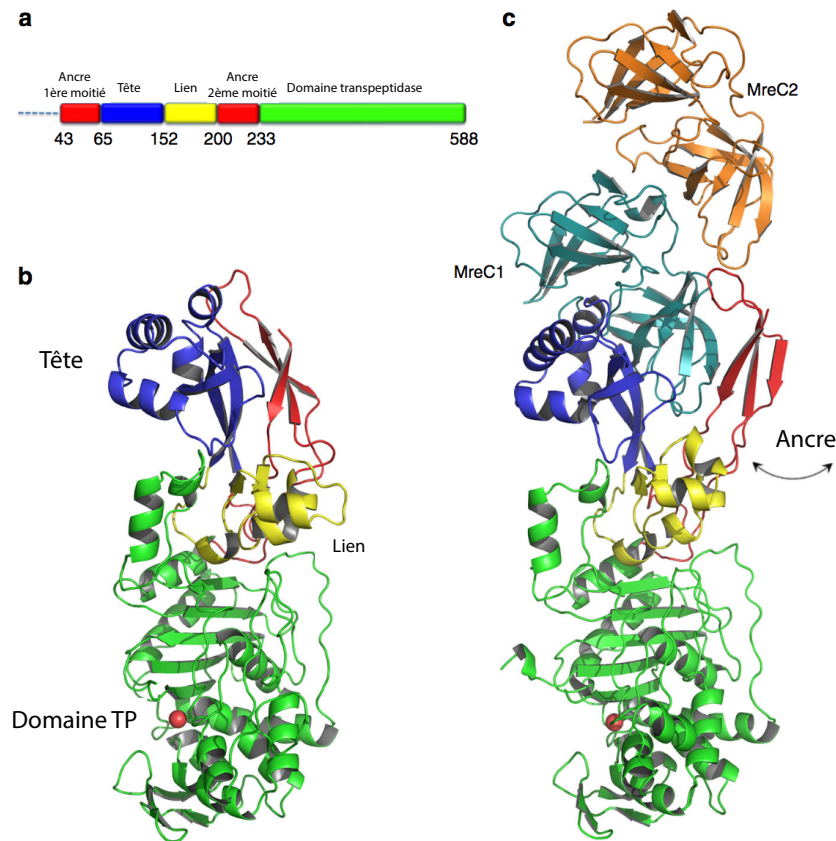


FIGURE 29: ARCHITECTURE ET ARRANGEMENT STRUCTURAL DE PBP2 ET DU COMPLEXE PBP2:MRE C DE HP²¹².

A. DIAGRAMME SCHEMATIQUE DE PBP2 ET LIMITATION DES DIFFERENTS DOMAINES. B. STRUCTURE DE PBP2 MONTRANT LA TETE (BLEU), LE DOMAINE TP (VERT), ET LA PARTIE LIANT LES DEUX DOMAINES (JAUNE). L'ANCRE EST ENCHASSEE CONTRE L'HELICE DE LA TETE. C. LA REGION DE L'ANCRE DE PBP2 S'ÉLOIGNE DE LA TETE AU TRAVERS DE MOUVEMENTS AU NIVEAU DE LA REGION CHARNIERE, EXPOSANT REGION HYDROPHOBIQUE PREALABLEMENT CACHEE QUI CONDUIT A LA LIAISON AVEC MRE C1.

L'activité GTase de PBP1 va catalyser l'assemblage du motif GlcNAc-MurNAc-pentapeptide sur la chaîne de glycane en formation. Le C1 du MurNAc de la chaîne en formation subit une attaque nucléophile par le groupement hydroxyle en position C4 du GlcNAc du lipide II. Cette réaction de transglycosylation conduit à une inversion de la configuration en C1, d'une α -configuration pour le précurseur en β -configuration pour l'accepteur glycosylé. La transglycosylation va ainsi former une nouvelle liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ libérant le transporteur lipidique sous sa forme inactive, C₅₅-PP, qui va pouvoir alors être recyclé²¹³. Récemment, la famille des protéines SEDS a été décrite comme possédant une activité GTase. Ces protéines ont été postulées comme fonctionnant en tandem avec les PBPs de classe B lors de l'élongation ou de la division de façon indépendante des PBPs de classe A²¹⁴.

L'activité TPase des PBP1, 2 et 3 va ensuite catalyser le lien entre deux chaînes de glycanes adjacentes. Ce lien de type $4 \rightarrow 3$ est réalisé généralement par l'attaque du groupement carbonyle du résidu D-Ala en position 4 d'un pentapeptide donneur sur le résidu *meso*-DAP en position 3 d'un pentapeptide accepteur chez *E. coli*, du résidu Gly pour *S. aureus* ou encore d'un résidu L-Lys chez *S. pneumoniae*. Cette étape va libérer le dernier résidu D-Ala. De plus, l'accepteur de la réaction de transpeptidation peut aussi être une molécule d'eau par une réaction de D-D-carboxypeptidation catalysée par le PBPs LMM. Cette réaction aboutie à l'hydrolyse du pentapeptide en térapeptide où le dernier résidu D-Ala est libéré empêchant ainsi un autre pont entre deux fragments de glycanes adjacents²¹⁵. Cette activité CPase est donc impliquée dans le degré de réticulation du PGN²¹⁶ (**Figure 30**).

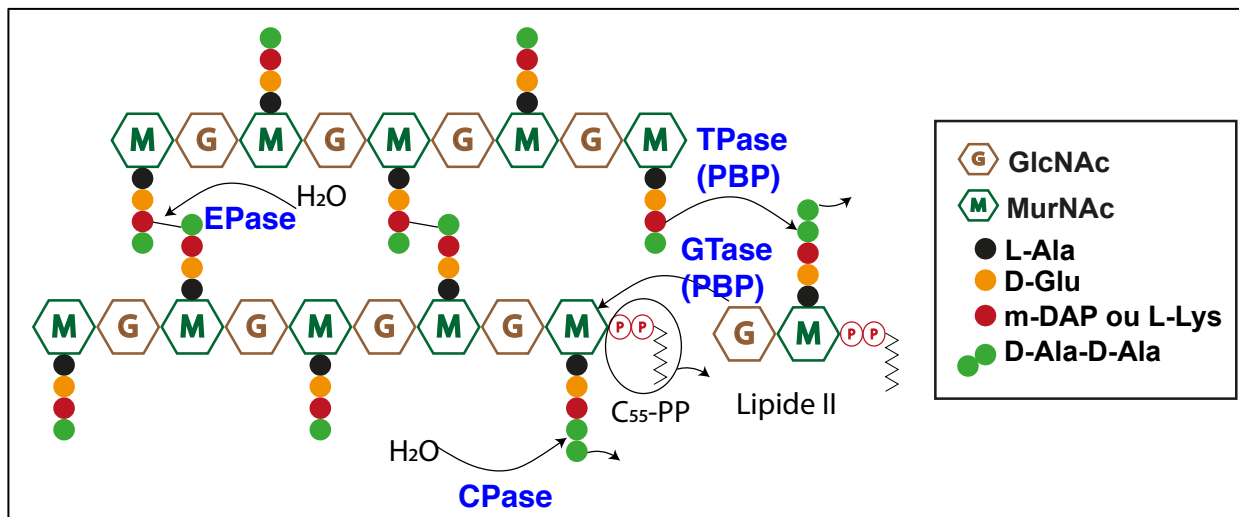


FIGURE 30: POLYMERISATION ET INCORPORATION DU PGN NEOFORME.

EPase : ENDOPEPTIDASE ; TPase : TRANSPEPTIDASE ; GTase : GLYCOSYLTRANSFERASE ; CPase : CARBOXYPEPTIDASE.

II. 2. C. b. 5. IMPORTANCE DES ENZYMES DE MATURATION DU PGN

Le PGN étant une molécule dynamique en perpétuelle remaniement, le PGN néoformé s'insère dans le PGN préexistant. Pour cela, il est requis l'intervention d'enzymes capables de dégrader le PGN préexistant laissant la place à l'incorporation du nouveau PGN. Ces étapes nécessitent l'intervention d'enzymes hydrolytiques en étroite lien avec les processus de croissance et division cellulaire. Les produits générés par ces enzymes vont pouvoir alors être recyclés. La méthode classique d'analyse de la composition du PGN se fait par *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC). En effet, après extraction et purification du PGN des bactéries, l'hydrolyse ménagée catalysée par la mutanolysine va générer des muuropeptides qui vont pouvoir ensuite être séparés par HPLC et analysés par spectrométrie de masse (**Figure 31**).

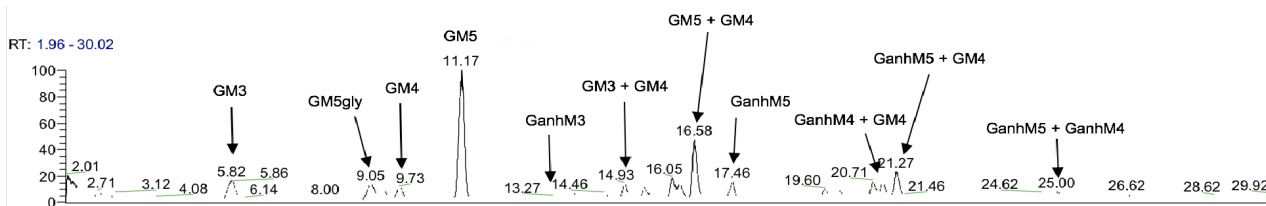


FIGURE 31: EXEMPLE DE PROFIL TYPE DE LA COMPOSITION EN MUROPEPTIDES OBTENUS APRES DIGESTION, SEPARATION PAR HPLC ET IDENTIFICATION DES MUROPEPTIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE HP SOUCHE N6.

De nombreuses études ont montré que le PGN de HP était unique, même s'il appartient au chémotype A1 γ comme *E. coli*, notamment, par sa très faible activité CPase. Après analyse de l'abondance relative des muuropeptides (mol%) présent chez HP, la fraction prédominante correspond à un pentapeptide intact comparé à d'autres souches comme *E. coli* (\approx 60 mol%). On retrouve également une chaîne avec une Gly en C-terminale à la place du dernier D-Ala (\approx 5 à 10 mol%) ainsi qu'un 1,6-anhydro-MurNAc-pentapeptides (\approx 13 à 18 mol%)²¹⁷. Ceci peut s'expliquer car HP n'a pas de PBPs LMM possédant les fonctions EP et/ou CP qui contribuent à l'hydrolyse ainsi qu'aux modifications post synthèse du PGN.

Cependant, cette bactérie possède des enzymes de maturation du PGN : deux transglycosylases lytiques Slt et MltD, une *N*-acétyl-muramoyl-L-alanyl amidase, AmiA, trois peptidases appartenant à la famille M23, Csd1, Csd2 et Csd3 (HdpA), une D-L-CPase, Csd4 et une L-D-EPase, Csd6.

Les deux transglycosylases lytique Slt (**HP0645**) et MltD (**HP1572**)²¹⁸ n'ont pas de fonction redondante. L'invalidation de chacun des deux gènes codant pour Slt et MltD n'a pas d'impact sur la morphologie bactérienne (**Figure 32. B**). Cependant, cela conduit à une diminution du niveau de l'anhydromuropeptide (qui constitue un muuropeptide contenant un résidu acide *N*-acétyl-anhydromuramique (anhM)), résidu signature de la fin des chaînes de glycanes des bactéries à Gram négatif. Ces deux mutants accumulent de longues chaînes de glycanes mais par des mécanismes différents. Le mutant *slt* en générant moins de courtes chaînes de glycanes, en particulier le disaccharide GlcNAc-anhM lui conférant plutôt une activité de transglycosylases lytique de type exo. Le mutant *mltD*, quant à lui, en réduisant le taux de chaîne de glycanes inférieure à 10-11 unités de disaccharide et en augmentant graduellement le taux de chaînes de glycanes supérieurs à 19 unités de disaccharide lui conférant plutôt une activité de transglycosylases lytique de type endo.

L'enzyme, AmiA (**HP0772**)^{219,220}, est une hydrolase importante chez HP impliquée dans la transition sous forme cocoïde. L'invalidation du gène *amiA* montre, d'une part, un blocage de la séparation des cellules filles formant des chaînettes de bactéries (**Figure 32. C**), une absence de passage sous forme cocoïde et une absence d'accumulation de GlcNAc-MurNAc-dipeptide corrélée

à la disparition du GlcNAc-MurNac-tripeptide caractéristique des formes cocoïdes. La quantité d'anhydromuropeptides augmente dans une souche sauvage lors de la croissance bactérienne. A l'inverse, dans un mutant *amiA*, cette quantité est diminuée. Cette différence est principalement dû à une diminution du dimère GlcNAc-anhM-tétrapeptide- pentapeptide-GlcNAc-MurNac (qui contribue à 60% à cette diminution). La protéine AmiA est composée d'un peptide signal suivie de la région N-terminale dont aucune homologie de séquence n'a été retrouvée, d'un peptide de liaison contenant une séquence répétée « KKEIP » et d'un domaine C-terminal possédant une homologie avec des protéines prédites pour avoir une activité amidase mais ceci n'a pas encore été confirmé et est toujours en cours d'étude au laboratoire. Il est possible que cette enzyme soit bi-fonctionnelle avec une région N-terminale portant l'activité CPase et C-terminale portant l'activité amidase.

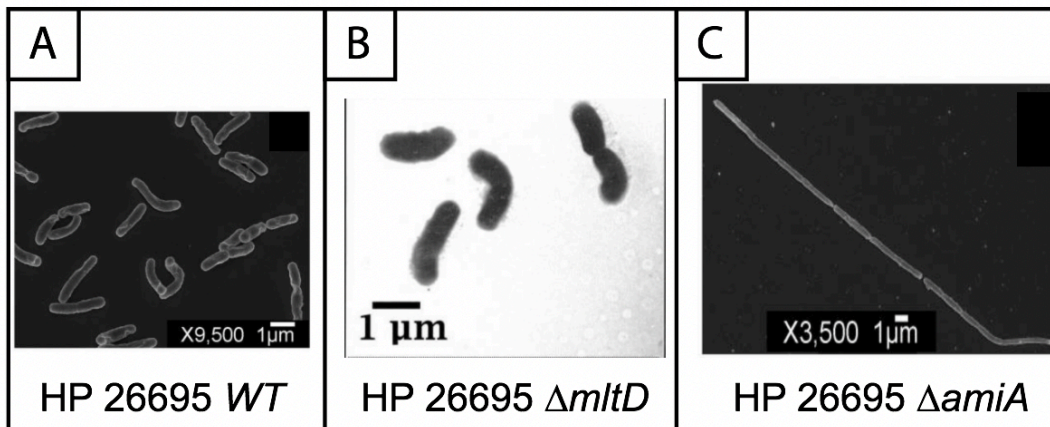


FIGURE 32: MORPHOLOGIES DE HP SOUCHE 26695.

A ET C. SOUCHE SAUVAGE ET MUTANT *amiA* EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE. B. MUTANT *mltD* EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. D'APRES CHAPUT^{218,219}.

Il existe également les protéines *Cell Shape Determinant* (Csd) 1 (HP1543), 2 (HP1544) et 3 (HP0506 ou HdpA) qui possèdent un domaine LytM suggérant une activité EPase ou CPase^{221,222}. Comme leur nom l'indique, ces protéines sont impliquées dans la morphologie bactérienne. En effet, la délétion du gène *csd1*, *csd2* entraîne un phénotype de bactérie en bâtonnets incurvés (Figure 33. B et C). L'invalidation du gène *csd3* entraîne une modification morphologique encore plus prononcée avec des bactéries très incurvées ou forme de « c » (Figure 33. D). Ces protéines

sont également impliquées dans la composition en mucopeptides du PGN. Les mutants invalidés pour les gènes *csd1*, *csd2* et *csd3* n'ont pas une modification de la longueur des chaînes de glycanes comme Slt ou MltD, mais un contenu en mucopeptides différent de la souche sauvage. Le changement le plus important observé est l'augmentation de 26 à 49% des dimères tétra-pentapeptides qui coïncide avec une diminution de 8 à 33% des monomères de tétra-peptides.

Le gène *csd4* code pour une zinc métallopeptidase appartenant à la famille des protéases M14 qui a une fonction de CPase sur le tripeptide du PGN. Quand la protéine Csd4 est absente, cela conduit à une perte de l'hélicité bactérienne et la formation de bactéries en bâtonnet bien droit (**Figure 33. E**). Un défaut de colonisation de l'estomac dans un modèle murin est également observé. Cette DL-CPase coupe les tripeptides monomériques en dipeptides via cette activité de CPase. D'autres modifications sont également observables comme une diminution de 400% du tétra-peptide et une augmentation de 300% du dimère tétra-tripeptide contrairement aux dimères tétra-tétra-peptides (51%) et tétra-pentapeptides (12%) qui sont diminués²²³.

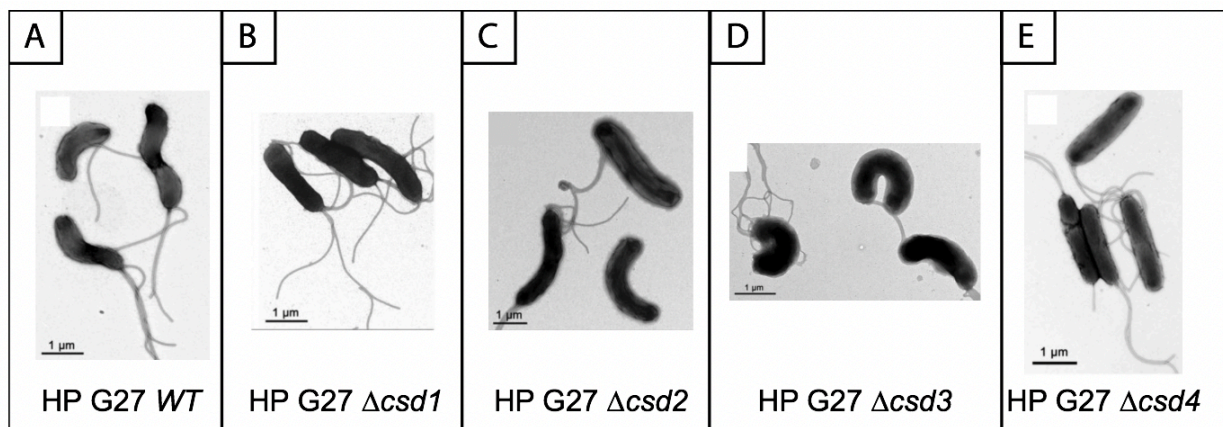


FIGURE 33: MORPHOLOGIES DE HP SOUCHE G27 OBSERVEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.

A. SOUCHE SAUVAGE. B-E. MUTANTS *csd1*, *csd2*, *csd3* ET *csd4*. D'APRES SYCURO²²¹.

Le gène *csd6* code pour la protéine Csd6 (**HP0518**) agissant en tant que LD-CPase responsable de la coupure des monomères tétra-peptides du PGN. L'absence de cette protéine entraîne une perte de la courbure naturelle de HP avec l'obtention, comme pour le mutant *csd4*, de bactéries bien droites. Lorsque le gène *csd6* est invalidé, les niveaux de di- et tripeptides monomériques ainsi que les tétra-tripeptides dimériques ne sont plus détectables. De plus, dans ce

même mutant, les niveaux de térapeptides et tétra-térapeptides dimériques sont augmentés, contrairement à la forme tétra-pentapeptides¹⁹⁸.

II. 2. C. c. VARIABILITE

De nombreuses modifications du PGN peuvent être observées augmentant la diversité de structure entre les espèces bactériennes. Ces variations peuvent être classées en deux parties : soit au sein de **la chaîne de glycanes** (longueur et/ou dans la structure elle-même de la chaîne), soit dans **la structure des peptides du PGN** (la nature des acides aminés et/ou la composition des ponts reliant les deux peptides).

II. 2. C. c. 1. VARIABILITE DES CHAINES DE GLYCANE

La longueur du polymère de sucre varie considérablement. Par exemple, pour les bactéries à Gram positif, chez *Bacillus*²²⁴, on retrouve entre 50 et 250 disaccharides et chez *Staphylococcus aureus*, environ 18. Pour les bactéries à Gram négatif, on retrouve généralement entre 20 et 40 disaccharides²²⁵. HP possède une très courte chaîne de glycanes d'environ 10 unités disaccharidiques. Cette chaîne devient plus courte lors du passage sous forme cocoïde en phase stationnaire de croissance²¹⁷. De plus, une chaîne de glycanes avec plus de 26 unités disaccharidiques représente environ 10-15% du total des chaînes de glycanes.

D'autres variations sont observées, comme une modification des sucres par différent processus²²⁶. De nombreuses bactéries à Gram positif modifient leur chaîne de glycanes par O-acétylation, déacétylation, ou encore par des N-glycosylations. Ces modifications entraînent une altération des propriétés de la paroi et jouent un rôle majeur dans la pathogénèse bactérienne. Les différentes modifications possibles du PGN sont observables sur la **Figure 34**. Celle la plus commune est la dé-N-acétylation d'un et/ou des deux sucres. Cette modification est réalisée par une déacétylase codée par le gène *pdgA*²²⁷ qui est principalement exprimé chez les bactéries à Gram positif, particulièrement chez le genre *Bacillus* ou *S. pneumoniae* accentuant la pathogénicité de souche²²⁸. Un PGN O-acétylé contient un nombre variable de 1,6-N,O-diacétyle acide muramique dont le MurNAc porte un groupement acétyle en position O-6. On retrouve cette modification chez

quelques espèces de bactéries à Gram positif comme *E. faecium* mais également chez les bactéries à Gram négatif comme chez *Neisseria sp.* Cette O-acétylation entraîne une résistance au lysozyme.

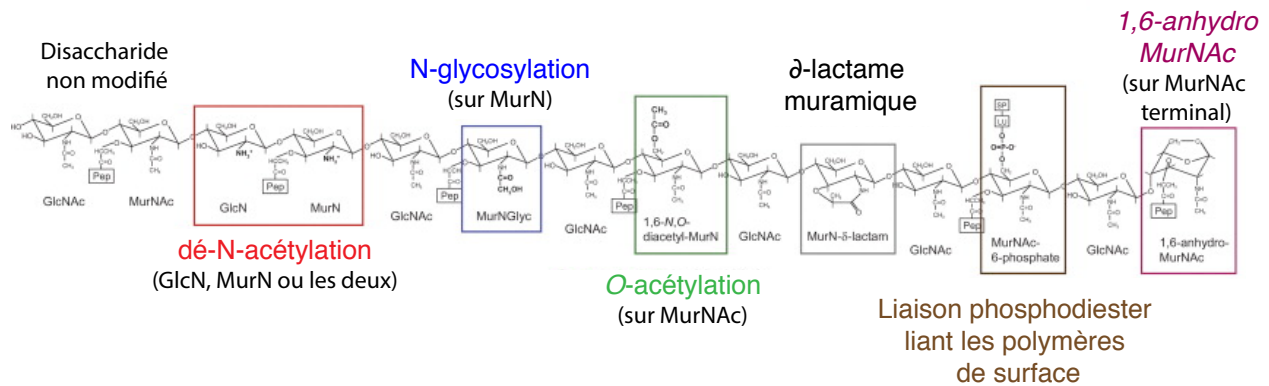


FIGURE 34: MODIFICATIONS DE LA CHAÎNE DE GLYCANES.

PEP: PEPTIDE ; LU : UNITE DE LIAISON ; SP : POLYMERE DE SURFACE. D'APRES VOLLMER²²⁹

II. 2. C. c. 2. VARIABILITE DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES

La composition du pentapeptide lié au MurNAc peut être différente d'une espèce bactérienne à l'autre (**Figure 35. A.**). Cette variabilité est due aux Mur ligases, décrite précédemment, qui vont avoir une spécificité de substrat différente d'une espèce à l'autre^{221,229}.

Le premier acide-aminé du pentapeptide est ajouté par MurC et chez la plupart des bactéries, cette enzyme ajoute un L-Ala. Dans des cas plus rares, on retrouve une Gly (*Microbacterium lacticum*) ou une L-Serine (Ser) (*Butyribacterium rettgeri*) à la place du L-Ala.

Le second acide aminé ajouté par MurD est bien conservé parmi les bactéries et on retrouve majoritairement du D-Glu en position 2 du pentapeptide. Lorsque que cet acide aminé est différent, il est important de noter que cette modification est dû uniquement post action des Mur ligases. C'est-à-dire, après ajout de cet acide aminé, il peut subir des modifications telle qu'une amidation, ce qui est commun chez les bactéries à Gram positif ou peut également être substitué par une Gly (*Thermus thermophilus*).

Le troisième acide aminé est celui qui montre la plus importante variabilité dans le pentapeptide. En effet, MurE catalyse l'ajout de *meso*-DAP (chez la plupart des bactéries à Gram négatif et chez *Bacillus*) et de L-Lys (chez la plupart des bactéries à Gram positif). On retrouve également dans la

littérature, en position 3, d'autres acides diaminés tels que de la L-Orn (Spirochètes), du LL-DAP (*Streptomyces albus*), du meso-lanthionine (*Fusobacterium nucleatum*) de la L-2,4-diaminobutyrique (*Corynebacterium aquaticum*) ou encore de la D-Lys (*Thermotoga maritima*), d'autres acides monoaminés tel que la L-homoSer (*Corynebacterium poinsettiae*), L-Ala (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) ou le L-Glu (*Arthrobacter J. 39*).

L'acide aminé en position 4 est de la D-Ala, retrouvé chez la plupart des espèces bactériennes.

Celui en position 5 du pentapeptide est variable même si c'est majoritairement l'acide aminé D-Ala qui est présent chez la plupart des espèces. Ce D-Ala peut être remplacé par une D-Ser (*E. gallinarum*), par un D-Lac (*Lactobacillus casei*). De plus, lorsque les deux derniers acides aminés formés sont D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser, la sensibilité aux antibiotiques telle que la vancomycine est plus faible.

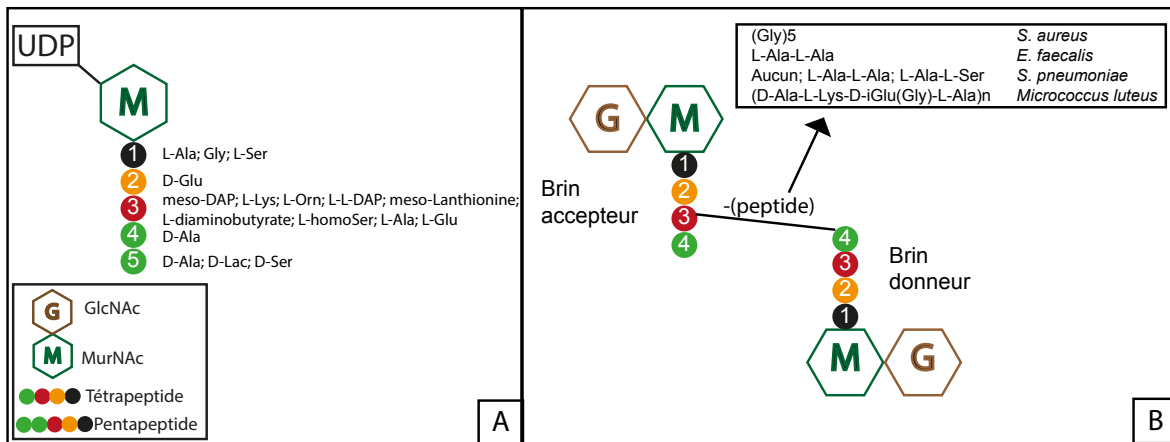


FIGURE 35: VARIABILITE DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES.

A. DES ACIDES AMINÉS DU PENTAPEPTIDE ; B. DU PONT INTER PEPTIDIQUE ENTRE LE BRIN DONNEUR ET LE BRIN ACCEPTEUR DES BACTÉRIES A GRAM POSITIF.

La variabilité des acides aminés du pentapeptide n'est pas la seule modification observable entre les espèces bactériennes. Il existe également une variabilité au niveau du pont peptide entre deux chaînes de glycanes. Ce pont peut être pour la plupart des bactéries à Gram négatif direct ou se faire au travers d'un pont inter peptidique comme chez la plupart des bactéries à Gram positif. La taille du pont inter peptidique peut varier d'un à sept résidus d'acides aminés. Quelques exemples sont retrouvés en **Figure 35. B** avec notamment la présence de cinq résidus Gly pour *S.*

*aureus*²³⁰, un dipetide L-Ala-L-Ala pour *E. faecalis*²³¹. On observe également des variabilités inter espèces comme chez *S. pneumoniae*²³². D'autres pontages existent entre deux chaînes de glycanes, tel que des ponts 3→3 ou encore 2→4 mais ne seront pas développés dans ce manuscrit.

II. 2. C. d. RECYCLAGE DU PGN ET IMPLICATION DANS LA PATHOGENESE BACTERIENNE

Comme indiqué précédemment, le PGN est une molécule dynamique. Ceci a pour impact une synthèse de nouveau PGN mais également un recyclage des métabolites libérés suite à l'action des enzymes de modification du PGN décrites précédemment. Ce mécanisme a été étudié en détail surtout chez les bactéries à Gram négatif. De façon générale, le passage de ces métabolites du périplasma vers le cytoplasme se fait par l'intermédiaire de deux perméases présentes dans la membrane cytoplasmique. On distingue donc la perméase Opp permettant un transport de la partie peptidique du PGN et la perméase AmpG qui elle s'occupe du transport du fragment GlcNAc-anhydroMurNAc-tétrapeptide²³³ (**Figure 36**). On estime à 45% le recyclage du PGN d'*E. coli* à chaque génération²³⁴. Les muuropeptides GlcNAc-anhydroMurNAc-tétrapeptide se retrouvent dans le cytoplasme grâce à la perméase AmpG et vont être la cible de l'amidase AmpD. Cette dernière catalyse la libération de la chaîne peptidique à partir de trois substrats différents :

- La forme GlcNAc-anhydroMurNAc-tétrapeptide directement transportée du périplasma libérant un tétrapeptide, qui sous l'action de la LD-CP LdcA²³⁵ passe sous forme tripeptide.
- la forme anhydroMurNAc-tétrapeptide après l'action de la glucosaminidase NagZ qui va libérer le GlcNAc. Le tétrapeptide comme pour le substrat précédemment passe sous forme tripeptide grâce à l'enzyme LdcA
- et la forme anhydroMurNAc-tripeptide après l'action de NagZ et de LdcA.

Les tripeptides générés vont alors être recyclés pour la synthèse du nouveau PGN en étant transférés grâce à la protéine MplA sur l'UDP-MurNAc²³⁶.

La perméase Opp va transporter le tétrapeptide dans le cytoplasme qui par LdcA devient un tripeptide réintégrant la voie de biosynthèse du PGN.

La partie saccharidique va également être recyclée. En effet, le GlcNAc généré par l'enzyme NagZ va aboutir à la formation d'UDP-GlcNAc grâce aux enzymes NagK (phosphorylation du GlcNAc en

position 6), puis par la déacétylase NagA (déacétylation du GlcNAc-6-P). Cette dernière étape fournit le GlcN-6-P, substrat nécessaire de l'enzyme GlmM qui est la deuxième enzyme impliquée dans la biosynthèse du PGN décrite précédemment²³⁷. L'anhydroMurNac quant à lui, va être phosphorylé par la protéine AnmK donnant du MurNac-6-P puis convertie par MurQ fournissant alors le substrat de l'enzyme NagA, le GlcNac-6-P. Chez *P. aeruginosa*, on retrouve une voie annexe pour le recyclage de l'anhydroMurNac. Après la phosphorylation par AnmK, le MurNac-6-P est déphosphorylé par l'enzyme MupP donnant du MurNac. Celui-ci va alors être phosphorylé en position 1 par AmgK formant du MurNac-1-P puis urydilé par MurU aboutissant à la formation de l'UDP-MurNac qui est la dernière étape avant de réintégrer le cycle de biosynthèse du PGN²³⁸.

Le recyclage du PGN chez HP est presque inexistant. La plupart des fragments de dégradation sont facilement disponibles dans le périplasme. Aucun homologue à la protéine AmpG n'a été décrit dans la littérature. HP ne possède que le système de transport Opp. **HP1252** et **HP1251** d'une part et **HP0251** et **HP0250**, d'autre part, sont les homologues de OppA et OppB, OppC et OppD, respectivement. Ces protéines forment un système de transport d'oligopeptides composé de OppA, la protéine liant le substrat, deux protéines intégrales de membrane, OppB et OppC et deux protéines ATPases, OppD et OppF. Il faut noter que la protéine OppF ne semble pas avoir d'homologue chez HP.

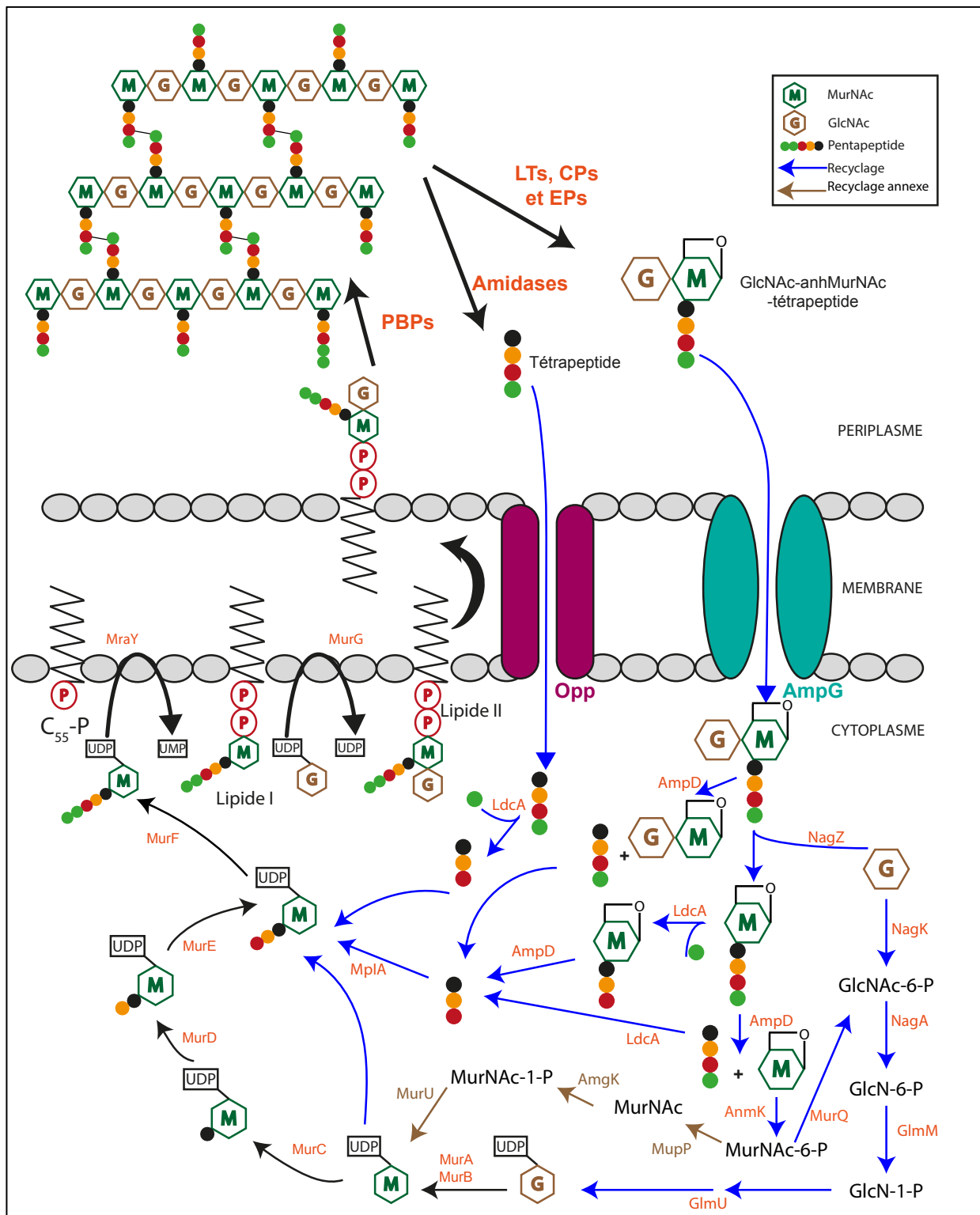


FIGURE 36: RECYCLAGE DU PGN.

Depuis de nombreuses années, il a été démontré que le PGN est un puissant effecteur biologique. En effet, les mucopeptides libérés interviennent dans des phénomènes de virulence et entraînent une réponse inflammatoire de l'hôte. Le PGN est impliqué dans des voies spécifiques comme, l'activation de macrophage²³⁹, du complément²⁴⁰, la production de monoxyde d'azote²⁴¹, d'anticorps, de cytokines²⁴² ou de peptides antimicrobiens²⁴³. En 2003, les récepteurs de l'immunité innée NOD1^{244,245} et NOD2^{246,247} ont été désignés comme senseurs des mucopeptides bactériens avec pour mucopeptides reconnus le GlcNAc-MurNac-tripeptides et le GlcNAc-MurNac-dipeptides, respectivement. N'importe quel mécanisme qui empêche la libération de ces mucopeptides constitue donc un moyen d'échapper au système immunitaire de l'hôte. La voie de recyclage du PGN décrite ci-dessus en réutilisant les produits de dégradation du PGN, peut donc potentiellement minimiser la stimulation du système immunitaire inné.

HP possède un système de sécrétion de type IV codé par le locus *cag* précédemment décrit dans le **Chapitre I. 2. A.** impliqué dans la sécrétion, par les cellules épithéliales gastriques, d'IL-8²⁴⁸. Une étude de 2004 a montré que la production d'IL-8 était dépendante de la voie NOD1. En effet, cette étude montre la translocation de petits fragments de PGN dans le cytosol des cellules épithéliales gastriques via le système de sécrétion de type IV. Dans un modèle murin, les souris déficientes pour le récepteur NOD1 sont plus sensibles à l'infection de souche de HP possédant l'îlot de pathogénicité *cagPAI* par rapport aux souris sauvages¹⁸.

CHAPITRE III. : LE METABOLISME DE L'UNDECAPRENYL PHOSPHATE

III. 1. GENERALITES

De façon générale, les lipides de type polyprényl-phosphate permettent de transporter les sucres au travers d'une membrane biologique. On retrouve cette fonction dans les différents domaines du vivant. Par exemple, chez les eucaryotes, la forme la plus commune de ce lipide est le polyprénol α -saturé ou dolichol qui est présent dans tous les tissus et la plupart des membranes des organelles des cellules eucaryotes. Le dolichol joue un rôle de transporteur des précurseurs de glycanes dans les processus de glycosylation des protéines²⁴⁹. La glycosylation des protéines est retrouvée chez les archées et les bactéries. Il y a deux mécanismes de la biosynthèse des glycoprotéines. D'une part, les sucres peuvent être attachés directement sur des protéines transporteurs par des GTases cytoplasmiques²⁵⁰ (glycosylation des flagellines et de certaines adhésines). D'autre part, les chaînes de glycane sont assemblées sur un transporteur lipidique avant leur transfert sur les protéines accepteurs. Dans ce cas, les oligosaccharyltransférases sont nécessaires à l'étape de glycosylation finale²⁵¹. Cette dernière voie ressemble au système de N-glycosylation des eucaryotes et conduit chez les bactéries à des phénomènes de N- et O-glycosylations.

L'undécaprényl phosphate (C_{55} -P) constitué de onze isoprènes condensés est le transporteur lipidique le plus retrouvé chez les bactéries. Dans les années 1970s²⁵², son implication essentielle dans la biosynthèse des polysaccharides de la paroi bactérienne a été démontrée autant chez les bactéries à Gram négatif que positif. En effet, ce transporteur est impliqué dans la biosynthèse du PGN (**Chapitre II. 2. C. b.**), du lipide A (**Chapitre II. 2. B. b. 2.**), de l'antigène O (**Chapitre II. 2. B. b. 3.**), des acides téchoïques⁶⁶ avant leur attachement au PGN, des polysaccharides capsulaires²⁵³ et de l'antigène commun aux entérobactéries²⁵⁴. L'inhibition de la synthèse du C_{55} -P ou du recyclage du C_{55} -PP entraîne un arrêt de la biosynthèse du PGN aboutissant à une lyse cellulaire²⁵⁵. Le C_{55} -P a pour origine la déphosphorylation de son précurseur, l'undécaprényl pyrophosphate (C_{55} -PP) et chez certaines espèces bactériennes, par la phosphorylation de l'undécaprénol.

III. 2. SYNTHÈSE DU C₅₅-PP

Les isoprénoïdes sont un groupe de produits naturels constitués d'unité(s) d'isopentényl à cinq carbones. Les prényltransférases sont les enzymes impliquées dans la biosynthèse des polymères d'isoprénoïdes linéaires et catalysent chaque réaction de condensation successive de type « tête-à-queue » C1'-C4 d'isopentényl pyrophosphate (C₅-PP) avec une molécule de farnésyl pyrophosphate (C₁₅-PP)²⁵⁶. On peut distinguer deux classes de prényltransférases en fonction de la stéréochimie de leurs produits qui résulte de la condensation de l'C₅-PP : les *cis*- et *trans*-isoprényl pyrophosphate synthases^{257,258} (**Figure 37**). Les réactions catalysées par ces enzymes démarrent par la rupture du pont entre le pyrophosphate et le groupement farnésyl, suivie d'une attaque électrophile du carbone 1 du farnésyl sur le carbone 4 de l'C₅-PP. Enfin, le proton présent sur le carbone 2 de l'C₅-PP va être éliminé et former une nouvelle double liaison.

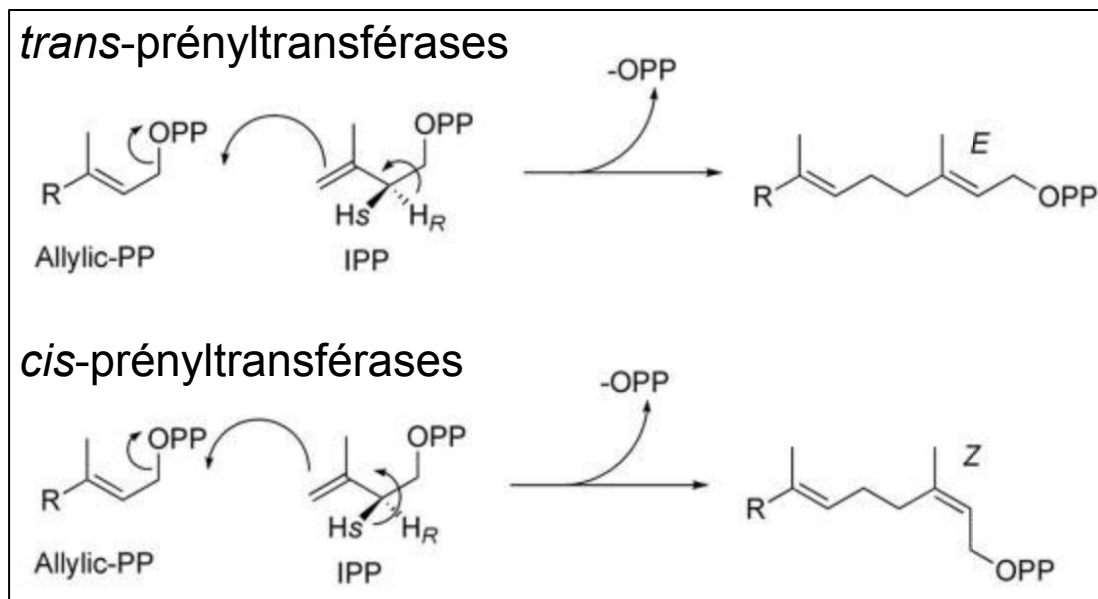


FIGURE 37: MECANISME D'ACTION DES DEUX CLASSES DE PRENYLTRANSFERASE.

Tous les C₁₅-PP proviennent de la condensation d'une unité d'isoprène sur un diméthylallyl-diphosphate formant un géranyl-diphosphate (C₁₀-PP). Cette étape est suivie par une seconde condensation catalysée par une farnésyl-diphosphate synthase, enzyme appartenant à la famille des *trans*-prényltransférases qui agit de façon séquentielle.

Le C₅₅-PP est synthétisé *de novo* par une condensation successive de huit unités d’C₅-PP avec une molécule de C₁₅-PP conduisant à la forme inactive du transporteur, le C₅₅-PP. Cette étape est catalysée par l’undécaprényl-pyrophosphate synthase (**UppS**) appartenant à la classe des *cis*-prényltransférases qui agit de façon concertée *a contrario* des enzymes *trans*. Le gène codant pour l’UppS a été découvert en premier chez *M. luteus*²⁵⁹ qui a aussi été la première description d’une *cis*-prényltransférase. Cette enzyme est essentielle chez *E. coli* et *S. pneumoniae*²⁶⁰.

L’UppS est une protéine soluble cytoplasmique formant un homodimère composé de deux sous-unités fortement associées par une structure de type « coiled coil » entre les hélices α5 de chaque monomère²⁶¹. L’activité de cette enzyme est dépendante de la présence d’ion Mg²⁺. La structure de l’UppS de HP (**HP1221**) a été résolue et apparaît similaire à celle d’*E. coli*²⁶² (**Figure 38**).

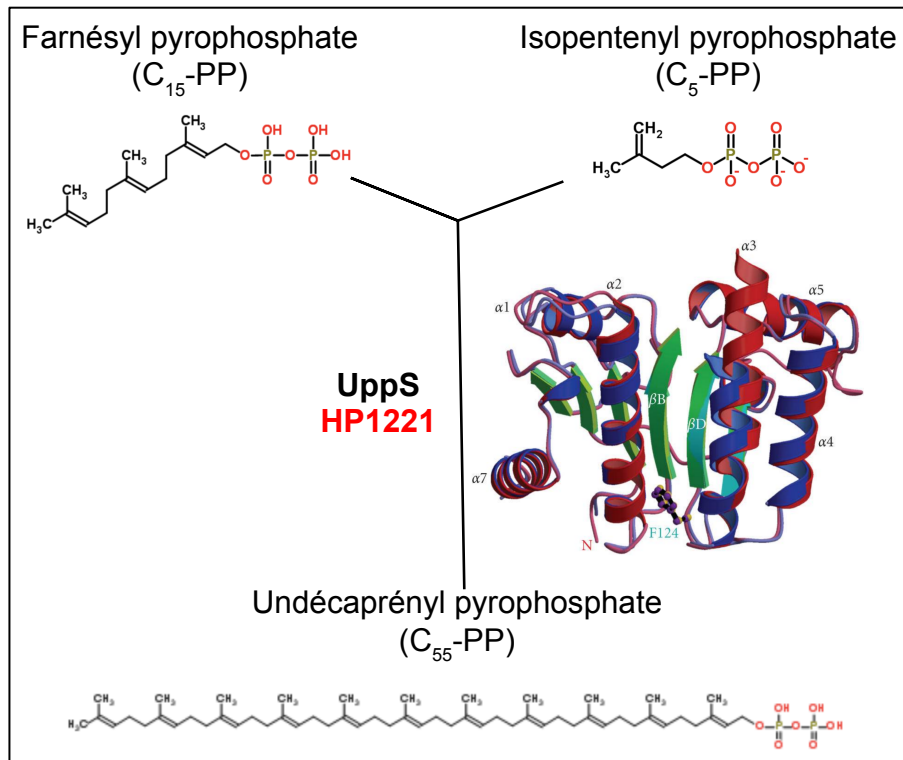


FIGURE 38: SYNTHÈSE DU C₅₅-PP.

LA STRUCTURE DE L’UPPS DE HP EST REPRÉSENTÉE À DROITE DE LA RÉACTION CHIMIQUE²⁶². LA PROTÉINE EST ÉGALEMENT UN DIMÈRE ET CHAQUE SOUS UNITÉ CONTIENT UN DOMAINE CATALYTIQUE ET UN DOMAINE D’APPARIEMENT. LES DEUX SOUS UNITÉS SONT ÉTROITEMENT ASSOCIÉES AU TRAVERS DU FEUILLET β CENTRAL ET UNE PAIRE DE LONGUES HÉLICES (α5 ET α6). LE DOMAINE CATALYTIQUE EST COMPOSÉ DE SIX FEUILLETS β ET DE QUATRE HÉLICES β ET LE SITE ACTIF EN FORME DE TUNNEL EST ENTOURÉ PAR DEUX HÉLICES α (α2 ET α3) ET QUATRE FEUILLETS β (βA, βB, βC ET βD). LA POSITION DE L’HÉLICE α3 DANS LES DEUX SOUS UNITÉS EST DIFFÉRENTE D’*E. COLI* ET ADOPTE UNE FORME OUVERTE ET FERMÉE DANS LES SOUS UNITÉS A ET B, RESPECTIVEMENT.

Ce transporteur étant impliqué dans de nombreuses voies de synthèses de composés essentiels à la survie bactérienne. Plusieurs études ont été menées pour trouver des molécules inhibitrices interférant avec sa biosynthèse. Pour cela, des analogues de l' C_5 -PP avec un fragment dicarboxylate à la place du diphosphate ont été synthétisés et testés en tant qu'inhibiteur de l'UppS ainsi que de la farnésyl transférase²⁶³. Cette étude a montré qu'un composé particulier, l'acide E-pentenylbutanedioïque inhibait l'UppS. Une autre étude a également pu mettre en évidence que certains bisphosphanates qui inhibent les *trans*-prényltransférases comme la farnésyl transférase pouvait également inhiber les *cis*-prényltransférases telle que l'UppS en présence d'une chaîne secondaire hydrophobique adaptée²⁶⁴. Enfin, deux inhibiteurs spécifiques de l'UppS de HP (occupant le site de fixation du C_{15} -PP sur l'UppS) ont pu être mis en évidence par modélisation informatique. Si ces molécules venaient à être confirmées, cela pourrait être une avancée dans le développement de nouvelles molécules antibiotiques contre HP sans éradiquer la bactérie intestinale *E. coli*.

III. 3. DEPHOSPHORYLATION DU C₅₅-PP

Une fois le C₅₅-PP formé, l'ultime étape pour activer ce transporteur est sa déphosphorylation en C₅₅-P. Il est important de noter que cette étape a lieu non seulement lors de la synthèse du transporteur *de novo* dans le cytoplasme mais également lors du recyclage de celui-ci après le transfert des unités de glycanes du lipide II au moment de la polymérisation du PGN dans le périplasme.

III. 3. A. LE GENE *bacA*

Depuis les années 1970s, cette étape de déphosphorylation est connue pour être la cible d'un antibiotique, la bacitracine, composé produit par certaines souches de *Bacillus licheniformis*²⁶⁵. Le composé le plus actif de cet antibiotique est la bacitracine A qui possède une très forte affinité pour le C₅₅-PP. Cet antibiotique est donc capable d'empêcher le passage sous forme active du transporteur par un mécanisme de séquestration du substrat, le C₅₅-PP. Rapidement, on observe un arrêt de la biosynthèse du PGN et une rapide lyse cellulaire (**Figure 39. A**).

C'est en 1993 qu'une étude²⁶⁶ a permis d'identifier le gène impliqué dans la résistance à la bacitracine, qu'ils ont appelé le gène *bacA*. En effet, en surexprimant ce gène via un plasmide inductible, ils ont observé une résistance à cet antibiotique. Cette protéine a été purifiée²⁶⁷ et décrite comme une protéine intégrale de membrane, hautement hydrophobe. Cette même étude a montré que la protéine BacA catalysait bien la déphosphorylation du C₅₅-PP en C₅₅-P confirmant son activité phosphatase dépendante de l'undécaprényl pyrophosphate (**UppP**). Lors de la surexpression de la protéine BacA, il y a compétition de substrat entre l'enzyme BacA et la bacitracine. Une partie du pool de C₅₅-PP séquestré va alors être déphosphorylé par la protéine BacA. Le transporteur se retrouve sous sa forme active et la synthèse du PGN reprend. On observe dans ce cas, une résistance à la bacitracine (**Figure 39. B**).

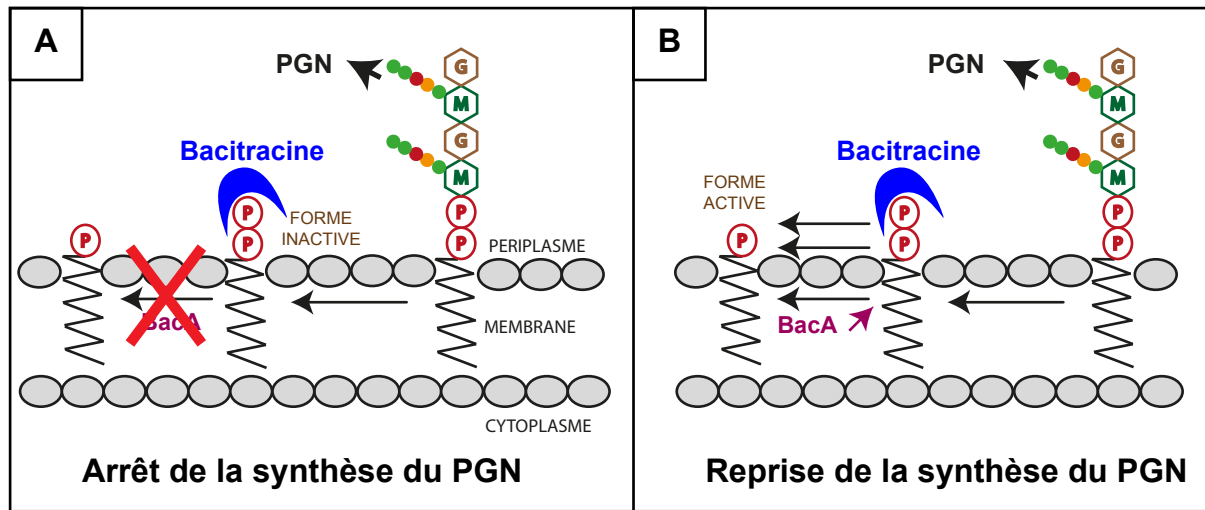


FIGURE 39: ACTION DE LA BACITRACINE ET MECANISME DE RESISTANCE.

A. SEQUESTRATION DU POOL D' C_{55} -PP PAR LA BACITRACINE ENTRAINANT UN ARRÊT DE LA BIOSYNTHESE DU PGN. B. MECANISME DE RESISTANCE A LA BACITRACINE. SUREXPRESSION DE LA PROTEINE BACA CONDUISANT A UNE DEPHOSPHORYLATION DU POOL DE C_{55} -PP NORMALEMENT SEQUESTRE PAR LA BACITRACINE ET UNE REPRISE DE SYNTHÈSE DU PGN.

Il existe des homologues du gène *bacA* chez de nombreuses bactéries, telles que *S. aureus*, *S. pneumoniae* avec 29% et 43% d'identité respectivement, *Mycobacterium smegmatis* ou encore chez *B. subtilis*²⁶⁸. De façon étonnante, l'inactivation de ce gène n'est pas létale pour ces bactéries tout comme chez *E. coli* alors que la présence du C_{55} -P est essentielle. On observe cependant, une augmentation de la sensibilité à la bacitracine pour toutes ces espèces, une atténuation de la virulence pour *S. aureus* et *S. pneumoniae*²⁶⁹ ainsi qu'une diminution de la formation de biofilm pour *M. smegmatis*²⁷⁰. Aucun homologue de BacA n'a été retrouvé chez HP. L'activité de BacA, avec pour substrat le C_{55} -PP, a été mesurée dans des extraits membranaires du mutant invalidé pour le gène *bacA*. Ceci a permis de mettre en évidence que la protéine BacA est responsable de 75% de l'activité UppP. Ce résultat est en corrélation avec le phénotype non létal observé pour ce mutant et laisse supposer l'implication d'une ou plusieurs autre(s) protéine(s) responsable(s) des 25% restants. Le mécanisme de déphosphorylation, ainsi que la face de la membrane interne où se déroule cette réaction sont restés sans réponses pendant de nombreuses années. En effet, des analyses bio-informatiques de la topologie de la protéine BacA ont établi différents modèles alternant une orientation cytoplasmique ou périplasmique du site actif^{271,272}. Ces données ne permettaient donc

pas d'établir si la protéine BacA jouait un rôle dans l'activation du transporteur *de novo* (face cytoplasmique) ou lors du recyclage (face périplasmique). De plus, deux études ont proposé alternativement l'His en position 30²⁷² et la Ser en position 27²⁷³ comme résidu catalytique central. Il est important de noter que la première étude identifiant l'His30 a été réalisée *in vitro* avec comme substrat le C₁₅-PP et non le substrat physiologique de BacA, le C₅₅-PP. Les expériences de caractérisation de la seconde ont été décrits *in vitro* mais également *in vivo* avec pour substrat le C₅₅-PP. Ces deux études ont montré que l'activité de BacA était dépendante de la présence de cations divalents, le Mg²⁺ ou le Ca²⁺. Cette dernière étude a permis d'établir une prédiction de la topologie membranaire de la protéine BacA comprenant sept segments transmembranaires avec deux larges boucles périplasmiques qui contiennent les deux domaines hautement conservés. Ces données ont établi que la protéine BacA catalyse la déphosphorylation du C₅₅-PP du côté périplasmique de la membrane interne laissant en suspens la protéine impliquée dans la déphosphorylation du côté cytoplasmique.

Enfin, la structure cristallographique de la protéine BacA a été résolue cette année dans deux publications différentes^{274,275} (**Figure 40 A. et B.**). Ces deux publications, en accord, ont permis de redéfinir de façon précise la topologie de BacA. Contrairement aux prédictions précédentes, la protéine BacA est composée de dix hélices enchâssées dans la membrane interne. Six d'entre elles sont transmembranaires (α 3-5 et α 8-10) et les quatre autres forment deux régions antiparallèles réentrantés hélice-boucle-hélice (α 1 et 2 ; α 6 et 7). Ces deux publications ont déterminé que la Ser en position 27 est bien le résidu central du site catalytique localisé dans la première hélice-double-hélice qui est située du côté périplasmique de la membrane. Grâce à la résolution de ces deux structures, nous pouvons donc admettre que BacA catalyse la déphosphorylation du C₅₅-PP lors du recyclage de celui-ci dans le périplasma.

Enfin, ces structures indiquent que le repliement de la protéine BacA correspond à un type « *interdigitating inverted-topology repeat* » (IITR). Ce type de repliement a été décrit chez des protéines transporteurs ou des canaux membranaires. Au regard de ces données, il est possible d'imaginer que la protéine BacA puisse agir comme un transporteur ou une flippase de son produit

de réaction, le C₅₅-P. Le modèle suivant a donc été proposé : après sa déphosphorylation dans le périplasma, le C₅₅-P est transporté au travers de la membrane interne par la protéine BacA pour entrer de nouveau dans le cycle de la biosynthèse du PGN. Cette hypothèse reste bien évidemment à démontrer.

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 40: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE BACA D'*E. COLI*.

A.²⁷⁴ A GAUCHE : LA PROTEINE A DEUX DOMAINES RELIES PAR UN AXE DOUBLE DANS LE PLAN DE LA MEMBRANE. CHAQUE DOMAINE SE COMPOSE DU MOTIF SUIVANT : UN DOUBLE ARC ET UNE HELICE EN SOUTIEN. CE DOUBLE ARC INCLUE UN ARC EXTERNE FORME PAR DEUX HELICES TRANSMEMBRANAIRES ET UN ARC INTERNE FORME PAR LA COURTE PAIRE D'HELICES REENTRANTES. A DROITE : REPRESENTATION DE LA TOPOLOGIE DE BACA SIMPLIFIEE POUR MONTRER LA SYMETRIE DE LA PROTEINE. B.²⁷⁵ A GAUCHE : DIMERE DE BACA. UN SEUL MONOMERE EST COLORE COMME LA STRUCTURE PRECEDENTE AVEC EN BLEU LE DOMAINE N-TERMINAL ET EN ROUGE LE DOMAINE C-TERMINAL. A DROITE : TOPOLOGIE DE BACA.

III. 3. B. LES PHOSPHATASES ACIDES PHOSPHATIDIQUES DE TYPE 2

Comme mentionné ci-dessus, le gène *bacA* n'est pas essentiel et la protéine BacA ne représente que 75% de l'activité UppP chez *E. coli*. Ces données suggèrent donc l'implication d'autres protéines ayant la même fonction.

Pour trouver d'autres UppP impliquées, certaines équipes de recherche ont étudié le mécanisme de résistance naturelle à la bacitracine chez la bactérie productrice de celle-ci, *B. licheniformis*²⁷⁶. Cette bactérie possède un transporteur dépendant de l'ATP qui lui permet, en tant que pompe à efflux, d'éliminer la bacitracine des cellules. Initialement, l'opéron *bcrABC* a été décrit comme les trois gènes codant pour ce transporteur. Des homologues aux gènes *bcrA*, *bcrB* et *bcrC* ont été retrouvés chez *E. faecalis*²⁷⁷, *B. subtilis*²⁷⁸ ou encore *Streptococcus mutans*²⁷⁹. Comme chez *B. licheniformis*, les gènes conférant la résistance à la bacitracine sont également organisés en opéron, ce qui n'est pas le cas chez *B. subtilis* pour le gène *bcrC* par rapport deux autres. De plus, chez *B. subtilis*²⁸⁰, *E. faecalis* et *S. mutans* l'expression de ces gènes est induite par un régulateur transcriptionnel. L'étude de ces trois gènes a permis d'identifier que ce sont les gènes *bcrA* et *bcrB* qui codent pour une pompe à efflux et que le gène *bcrC* confère quant à lui une résistance à la bacitracine d'une manière indépendante²⁸¹. Le gène *bcrC* d'*E. faecalis* code pour un homologue de la protéine BacA, ce qui n'est pas le cas pour les souches de *B. licheniformis* et *B. subtilis*. Les protéines identifiées de ces deux souches appartiennent à une autre famille de protéines : **Les phosphatases acides phosphatidiques de type 2 (PAP2)**. Chez *B. subtilis*, en plus de l'orthologue YubB de BacA, et de BcrC pour la superfamille de PAP2, il existe une deuxième enzyme, YodM²⁶⁸ appartenant aux PAP2. Une caractérisation biochimique montra que YodM est la principale PGP phosphatase de *B. subtilis* en plus de son activité UppP. Sa structure cristallographique²⁸² a été résolue récemment et montre que cette enzyme aurait pour fonction principale, la déphosphorylation du PGP en PG lors de la biosynthèse des phospholipides, ce qui expliquerait pourquoi elle n'est pas impliquée dans le mécanisme de résistance à la bacitracine.

Chez *E. coli*, le premier homologue de BcrC a été décrit en 1999²⁸³. En effet, cette étude a montré que le gène *bcrC_{EC}*, renommé par la suite *ybjG*, code pour une protéine qui possède 30% d'identité avec la protéine BcrC de *B. licheniformis* suggérant une fonction commune. Les auteurs ont montré que YbjG modulait la résistance à la bacitracine chez *E. coli*. Cette observation implique que les phosphatases de la superfamille des PAP2 auraient un rôle similaire de déphosphorylation du C₅₅-PP de la même façon que la protéine BacA. La protéine BcrC de *B. subtilis* a été purifiée en 2005 et les auteurs ont bien démontré son activité UppP²⁶⁸.

Par homologie de séquence, deux autres UppP appartenant à la famille des PAP2 ont été retrouvées chez *E. coli*, les protéines PgpB (impliquée dans la voie de synthèse des phospholipides comme YodM chez *B. subtilis* (**Chapitre II. 2. A. b. 3.**)) et YeiU renommée par la suite LpxT²⁸⁴. En effet, au sein de ces protéines est retrouvée la signature typique des phosphatases appartenant à la famille des PAP2 décrite précédemment²⁸⁵ : KX₆RP-(X₁₂₋₅₄)-PSGH-(X₃₁₋₅₄)-SRX₅HX₃D. Cette signature est souvent divisée en trois motifs : **C1** : KX6RPF, **C2** : PSGH, et **C3** : SRX5HX3D. Cette séquence n'est pas présente dans la protéine BacA. La surexpression des protéines YbjG, LpxT et PgpB augmente de 5, 10 et 70 fois, respectivement, l'activité UppP dans les membranes. Ces résultats confirment que ces trois protéines sont impliquées dans l'activité UppP retrouvée dans les membranes. Il est important de noter que seul un triple mutant *bacA-pgpB-ybjG* est létal pour *E. coli*. Cela est corrélé avec le fait que la surexpression de BacA, PgpB et YbjG et pas de LpxT entraîne une résistance à la bacitracine.

Ces données suggèrent que LpxT est impliquée dans une autre voie que la déphosphorylation du C₅₅-PP. La majorité du lipide A d'*E. coli* contient des groupements monophosphates en position 1' et 4'. Les gènes qui codent pour ces réactions enzymatiques ont été identifiés¹³¹. Cependant, environ un tiers du lipide A du LPS contient un groupement di-phosphate en position 1' (Kdo₂-Lipide A-1-diphosphate) et le mécanisme en jeu était encore inconnu jusqu'en 2008. LpxT a par la suite été caractérisée et identifiée comme la protéine modifiant le lipide A du LPS d'*E. coli*²⁸⁶. Cette étude a montré que LpxT avait en plus de sa fonction d'UppP, une fonction de phosphotransférase et catalysait le transfert du groupement phosphate du C₅₅-PP sur le lipide A en position 1 conduisant à sa forme Kdo₂-Lipide A-1-diphosphate (**Figure 41**).

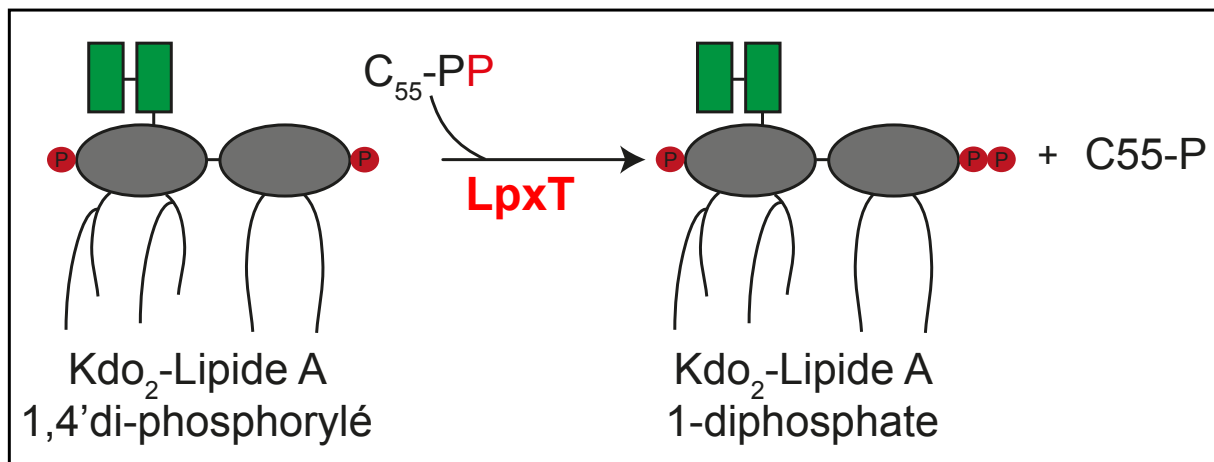


FIGURE 41: MECANISME D'ACTION DE LA PROTEINE LpxT SUR LE LIPIDE A DU LPS D'*E. COLI*.

La topologie prédite de PgpB consiste en six hélices transmembranaires avec un centre catalytique localisé du côté périplasmique de la membrane interne et des extrémités N- et C-terminales dans le cytoplasme¹⁰⁰. La structure cristallographique de PgpB d'*E. coli* a été résolue en 2014²⁸⁷ et vient confirmer ces prédictions. En effet, PgpB est bien composé de six hélices transmembranaires et d'un petit domaine périplasmique constitué de 70 acides aminés. Les extrémités N- et C-terminales se situent dans le cytosol. Le domaine périplasmique est inséré entre les segments transmembranaires 3 et 4 et contient quatre hélices ($\alpha 2$ à $\alpha 5$). Le potentiel site actif est formé par les motifs C1, C2 et C3 de la signature des PAP2 et localisé du côté périplasmique de la membrane interne avec une charge fortement positive. De plus, les segments transmembranaires 2 et 3 forment un sillon ouvert en forme de V qui correspondrait à l'entrée du substrat.

"En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version"

FIGURE 42: STRUCTURE DE LA PROTEINE PGPB D'*E. COLI*²⁸⁷.

A. REPRESENTATION DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE PGPB. LES EXTREMITES N- ET C-TERMINALES SONT COLOREES EN BLEU ET ROUGE RESPECTIVEMENT. LES MOTIFS CONSERVES C1, C2 ET C3 SONT MARQUES EN OVALES. TM : SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES. $\alpha 2$ A $\alpha 5$: HELICES QUI SONT PRESENTES DANS LA BOUCLE PERIPLASMIQUE. B. TOPOLOGIE DE PGPB. 1 A 6 : SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES.

Les deux modèles topologiques des enzymes YbjG et LpxT prédisent comme pour PgpB, que ces deux enzymes possèdent le motif spécifique des phosphatases acides orienté vers l'espace périplasmique. Les enzymes YbjG et LpxT seraient donc actives dans le périplasma²⁷¹ au moment du recyclage du transporteur.

III. 3. C. LES PAP2 DE HP

HP, de façon originale, n'exprime qu'une seule famille d'UppP. Aucun homologue de la famille BacA n'a été retrouvé mais quatre gènes, codant pour des potentielles UppP appartenant à la superfamille des PAP2 et orthologue à PgpB d'*E. coli*, ont été détectés dans le génome. Il s'agit des gènes *hp0021*, *hp0350*, *hp0851* et *hp1580*.

HP0021 a été caractérisée en première et son implication dans la structure finale du LPS de HP, établie. La structure du lipide A de HP n'est pas commune car il manque le groupement phosphate en position 4' et il est tétra ou penta-acylé avec une chaîne avec 16 ou 18 carbones^{288,289}. De plus, le groupement sur le carbone 1 est modifié d'un PE²⁹⁰, ce qui n'est pas le cas pour le lipide A d'autres bactéries à Gram négatif comme *E. coli*²⁹¹, *S. tyhimurium*²⁹² ou encore *N. meningitidis*²⁹³. Les modifications du lipide A de HP sont constitutives. Une étude sur le lipide A de *Rhizobium leguminosarum*²⁹⁴ a permis d'identifier la protéine LpxE en tant que phosphatase qui enlève de façon spécifique le groupement phosphate en position 1 du lipide A. Cette enzyme possède également une homologie à PgpB d'*E. coli* principalement pour les résidus conservés du site actif. L'activité 1'-phosphatase²⁹⁵ a donc été mesurée pour les quatre orthologues de PgpB chez HP. Les auteurs ont montré que HP0350, HP0851 et HP1580 ne possédaient pas cette activité et que HP0021 était responsable de la déphosphorylation du phosphate en position 1 du lipide A. Cette même étude a décrit deux étapes successives de modifications du lipide A de HP : celui-ci va être déphosphorylé en position 1 par HP0021 (renommée par la suite LpxE) et une deuxième enzyme HP0022 (EptA), va ajouter le PE sur le squelette di-saccharidique.

Pour échapper au système immunitaire, les bactéries peuvent mettre en place différents mécanismes. L'un d'entre eux est de masquer la charge négative du lipide A en retirant les groupements phosphates, tout en ajoutant un groupement de charge positive comme la PE. Cette diminution de la charge négative à la surface de la bactérie entraîne une résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs). Il a également été décrit que changer le taux d'acylation ou encore le nombre de sucre Kdo module la résistance aux CAMPs²⁹⁶ ou la reconnaissance par le

système immunitaire inné médié par le complexe *Toll like receptor 4* (TLR4) / *Myeloid differentiation factor 2* (MD-2)²⁹⁷. Suite à la caractérisation de LpxE de HP, la même équipe a observé l'impact de la déphosphorylation du lipide A sur la résistance aux CAMPS en utilisant la sensibilité à la polymyxine B comme agent mimant le peptide antimicrobien²⁹⁷. Ils ont pu alors constater que la souche invalidée pour le gène *lpxE* était 1000 fois plus sensible à la polymyxine B que la souche sauvage. Cette sensibilité est due à la présence du groupement phosphate en position 1 du lipide A (vérifiée par spectrométrie de masse) à la place de la PE qui augmente considérablement la charge négative de celui-ci. L'analyse de la séquence protéique de LpxE prédit que les motifs conservés des phosphatases font face au côté périplasmique de la membrane interne. La même équipe a prouvé que les modifications du lipide A de HP avaient lieu après la translocation du Kdo₂-lipide A di-phosphorylé par le transporteur MsbA dans le périplasme²⁹⁸.

En collaboration avec le laboratoire²⁹⁹, l'enzyme responsable de la déphosphorylation en position 4 du lipide A a été identifiée. Par analyse bio-informatique, HP1580 a été prédit comme possédant cinq segments transmembranaires avec l'extrémité N-terminale localisée dans le périplasme. De plus, cette enzyme possède 20% d'identité avec LpxE de HP. Grâce à des expériences *in vitro* de radiomarquage du phosphate en position 4 du lipide A de HP, les auteurs ont pu montrer que dans un mutant invalidé pour le gène *jhp1487* (qui est l'homologue *hp1580* dans la souche de HP J99), l'activité 4'-phosphatase était abolie et restaurée par complémentation du gène directement sur le chromosome. Les espèces de lipide A obtenues au sein des souches de HP invalidées pour les gènes *lpxE* et *lpxF* seuls, dans un double mutant *lpxE/lpxF* et dans les souches complémentées ont été analysées par spectrométrie de masse. Ces résultats ont permis d'établir la voie complète de modification du lipide A de HP présentée **Figure 43**. Les auteurs se sont ensuite intéressés au lien entre ces deux enzymes, LpxE et LpxF, et la pathogénicité de HP. Dans un premier temps, ils ont testé la résistance aux CAMPS par l'intermédiaire de la sensibilité à la polymyxine. Ils ont observé que les souches de HP invalidées pour les gènes *lpxE*, *lpxF* ou *lpxE/lpxF* avaient une sensibilité de 16, 360 et 1020 fois plus importantes que la souche sauvage, respectivement. Pour confirmer l'importance de ces deux enzymes dans la résistance aux CAMPS, d'autres peptides

présents lors d'une infection par un pathogène chez l'Homme ont été testés. Les trois mêmes souches ont montré des sensibilités augmentées pour la cathélicidine humaine **LL-37** (produite par les cellules épithéliales et les leucocytes), pour le **P-113** qui est un fragment de l'histatine 5 (retrouvé dans la cavité orale) et pour la **β -défensine humaine de type 2** (retrouvée dans le tractus gastro-intestinal). De plus, l'activité de LpxF semble être la plus importante pour la résistance aux CAMPs. Une souche invalidée pour le gène *lpxR*, responsable de la dernière étape de modification du lipide A par déacylation, ne montre aucune différence de sensibilité pour les mêmes peptides testés. Chez HP, la déacylation ne semble donc pas avoir de rôle dans la résistance aux CAMPs.

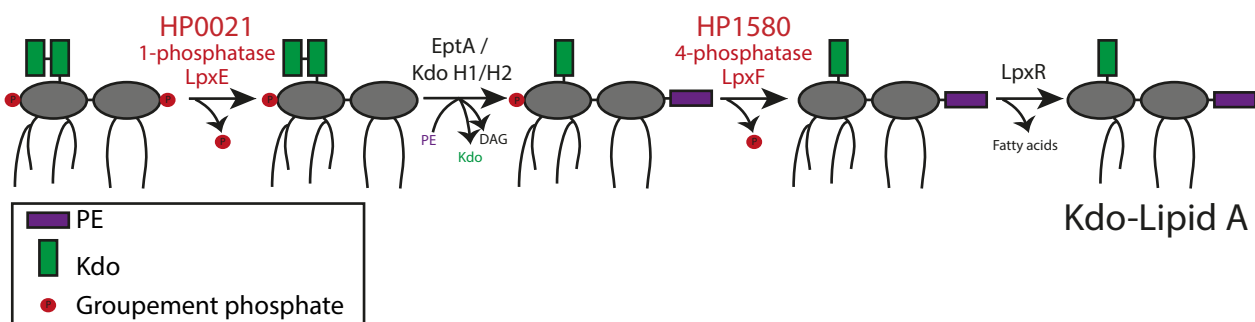


FIGURE 43: ÉTAPES DE MODIFICATION DU LIPIDE A DE HP.

Contrairement aux autres entérobactéries, notamment *E. coli*, HP à un pouvoir 1000 fois moins endotoxique¹⁵. De nombreuses études ont décrit que la réponse immunitaire induite par HP été médiée par les récepteurs de l'immunité innée *human Toll-like receptor 2 (hTLR2)*^{300,301} et d'autres via les récepteurs *hTLR4-MD2*^{302,303}. C'est pourquoi, la recherche de l'impact des modifications générées par les deux UppP, LpxE et LpxF sur le système immunitaire via ces deux récepteurs a été étudiée. Dans un modèle cellulaire, les auteurs ont mis en évidence que le LPS de HP extrait des mutants *lpxE*, *lpxF* et *lpxE/lpxF* activait les récepteurs *hTLR4-MD2* de 2, 6 et 10 fois et de 10, 8 et 5 fois, les récepteurs *murin(m)TLR4-MD2* par rapport à la souche sauvage, respectivement. Aucune activation significative n'a été retrouvée pour les récepteurs *hTLR2* et *mTLR2*, même à des concentrations de LPS très importantes. Enfin, des expériences *in vivo* de colonisation dans un modèle murin de souris sauvages et déficientes pour les récepteurs *mTLR4* ont été réalisées. Le modèle de colonisation de souris sauvages a montré que LpxE était importante

pour la colonisation et que LpxF était essentielle. Le double mutant était, quant à lui, incapable de coloniser l'estomac de souris. Ces résultats indiquent que les modifications du lipide A chez HP générées par les deux PAP2, LpxE et LpxF sont essentielles à la colonisation de l'hôte.

Dans le cas de la colonisation chez les souris déficientes pour les récepteurs *mTLR4*, le simple mutant *lpxF* et le double *lpxE/lpxF* ne sont plus capables de coloniser l'estomac de souris. La colonisation du mutant *lpxE* est restaurée après 45 jours de colonisation de ce type de souris contrairement aux souris sauvages.

Ces données suggèrent que la déphosphorylation du lipide A par LpxE et LpxF chez HP confère une résistance aux CAMPs avec une diminution de l'activation des récepteurs *hTLR4-MD2*. LpxF possède un impact plus important dans les deux cas. Enfin, ces deux enzymes sont essentielles à la colonisation de HP dans un modèle murin.

Des analyses bio-informatiques ont montré que HP0350 et HP0851 sont des paralogues proches qui ont évolué après une duplication. Les prédictions de topologie de ces deux protéines supposent la présence de six segments transmembranaires, similaires aux PAP2 d'*E. coli* avec l'extrémité N-terminale localisée dans le cytoplasme. Aujourd'hui, aucun article scientifique n'a encore été publié afin de caractériser ces deux enzymes.

CONTEXTE

La biosynthèse de tous les polysaccharides de l'enveloppe bactérienne (PGN, antigène O, etc.) nécessite la translocation au travers de la membrane plasmique, des sous-unités de glycanes qui sont produites dans le cytoplasme. Ces unités de glycanes doivent être liées à un transporteur lipidique, le C₅₅-P, aboutissant à la formation d'intermédiaires membranaires qui vont ensuite être transportés à la face externe de la membrane interne. Suite au transfert des fragments de glycane sur son accepteur final, le transporteur lipidique est relâché dans le périplasma sous forme pyrophosphate inactive, C₅₅-PP. Le C₅₅-P est synthétisé par déphosphorylation du C₅₅-PP, lui-même provenant soit de sa synthèse *de novo* ou du recyclage. La synthèse *de novo* du C₅₅-PP s'effectue du côté cytoplasmique de la membrane interne grâce à l'enzyme essentielle UppS. Les mécanismes étant en jeu lors de cette synthèse sont bien caractérisés dans la littérature. Le recyclage du C₅₅-PP s'effectue grâce à deux familles d'enzymes appelées les UppP : D'une part la famille BacA et d'autres part les membres de la superfamille PAP2. Chez *E. coli*, il existe une UppP appartenant à la famille BacA et trois appartenant à la superfamille des PAP2 : LpxT, PgpB et YbjG avec des fonctions redondantes où seule une triple invalidation des gènes *bacA/pgpB/ybjG* est létale pour la bactérie. HP ne possède pas d'UppP de la famille BacA mais quatre appartenant à la superfamille des PAP2 : HP0021 (LpxE), HP0350, HP0851 et HP1580 (LpxF). Plusieurs études ont montré les caractéristiques particulières des UppP appartenant à la famille des PAP2 comme une double fonction ou encore des activités secondaires de phosphotransférase. Chez *E. coli*, PgpB, en plus de son activité UppP, est impliquée dans la biosynthèse des phospholipides tout comme YodM chez *B. subtilis*. L'enzyme LpxT, quant à elle, catalyse le transfert du groupement phosphate du C₅₅-PP sur le lipide A. Chez HP, LpxE et LpxF, modifient également le lipide A par déphosphorylation en position 1 et 4'. Ces modifications permettent à HP de survivre dans la muqueuse gastrique en conférant une résistance aux CAMPs et un échappement au système immunitaire de l'hôte.

Ces travaux de recherche visent à caractériser le rôle physiologique des PAP2 de HP, particulièrement, HP0851 et HP0350, en étudiant leur impact sur le métabolisme de l'enveloppe, ainsi que leur rôle dans la relation hôte-pathogène.

MATERIELS ET METHODES

I. 1. SOUCHES ET PLASMIDES

Souches	Génotype	Résistance	Référence
<i>E. coli</i>			
BWT <i>sbacA</i>	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB::Kan</i> + pMAK <i>bacA</i>		284
BWT <i>sbacA</i> + pTrcl <i>pxE</i>	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB::Kan</i> + pMAK <i>bacA</i> + pTrcl <i>pxE</i>		Ce travail
BWT <i>sbacA</i> + pTrchp0350	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB::Kan</i> + pMAK <i>bacA</i> + pTrchp0350		Ce travail
BWT <i>sbacA</i> + pTrchp0851	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB::Kan</i> + pMAK <i>bacA</i> + pTrchp0851		Ce travail
BWT <i>sbacA</i> + pTrcl <i>pxF</i>	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB::Kan</i> + pMAK <i>bacA</i> + pTrcl <i>pxF</i>		Ce travail
<i>H. pylori</i>			
N6	N6		304
HP-2	N6 <i>lpxE::Genta</i>	Genta	Ce travail
HP-3	N6 <i>hp0350::Kan</i>	Kan	Ce travail
HP-4	N6 <i>lpxF::Kan</i>	Kan	Ce travail
HP-13	N6 <i>hp0851::Kan</i>	Kan	Ce travail
HP-5	N6 +pILL2150	Cm	Ce travail
HP-7	N6 +pILL2150 <i>bacA</i>	Cm	Ce travail
HP-8	N6 +pILL2150 <i>lpxT</i>	Cm	Ce travail
HP-9	N6 +pILL2150 <i>pgpB</i>	Cm	Ce travail
HP-10	N6 +pILL2150 <i>ybjG</i>	Cm	Ce travail
HP-14	N6 + pILL2150 <i>lpxE</i>	Cm	Ce travail
HP-15	N6 + pILL2150 <i>hp0350</i>	Cm	Ce travail
HP-16	N6 + pILL2150 <i>lpxF</i>	Cm	Ce travail
N6 +pILL2157 <i>bacA</i>	N6 +pILL2157 <i>bacA</i>	Cm	Ce travail
N6 +pILL2157 <i>lpxT</i>	N6 +pILL2157 <i>lpxT</i>	Cm	Ce travail
N6 +pILL2157 <i>pgpB</i>	N6 +pILL2157 <i>pgpB</i>	Cm	Ce travail
HP-6	N6 +pILL2157	Cm	Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>lpxE</i>	Kan, Cm	Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>hp0350</i>	Kan, Cm	Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>hp0851</i>	Kan, Cm	Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>lpxF</i>	Kan, Cm	Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + piLL2150 <i>bacA</i>		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + piLL2150 <i>lpxT</i>		Ce travail

	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>pgpB</i>		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2150 <i>ybjG</i>		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2157 <i>bacA</i>		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2157 <i>lpxT</i>		Ce travail
	N6 <i>hp0851::KanR</i> + pILL2157 <i>pgpB</i>		305
X47	X47-2AL		
	X47 <i>hp0350::KanR</i>	Kan	Ce travail
HP-46	X47 <i>hp0851::KanR</i>	Kan	Ce travail
Plasmides			
Topo TAD <i>lpxE</i>	Locus <i>hp0020-lpxE</i> ::Gm- <i>hp0022</i> cloné dans le TOPO TA	Genta	Ce travail
pTrc <i>lpxE</i>	pTrc99 <i>lpxE</i>	Amp	Ce travail
pTrcHis <i>lpxE</i>	pTrcHis30 <i>lpxE</i>	Amp	Ce travail
pTrch <i>hp0350</i>	pTrc99 <i>hp0350</i>	Amp	Ce travail
pTrcHis <i>hp0350</i>	pTrcHis30 <i>hp0350</i>	Amp	Ce travail
pTrch <i>hp0851</i>	pTrcHis30 <i>hp0851</i>	Amp	Ce travail
pTrc <i>lpxF</i>	pTrc99 <i>lpxF</i>	Amp	Ce travail
pTrcHis <i>lpxF</i>	pTrcHis30 <i>lpxF</i>	Amp	Ce travail
pILL2150 <i>lpxE</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>hp0350</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>hp0851</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>lpxF</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>bacA</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>lpxT</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>pgpB</i>		Cm	Ce travail
pILL2150 <i>ybjG</i>		Cm	Ce travail
pILL2157 <i>bacA</i>		Cm	Ce travail
pILL2157 <i>lpxT</i>		Cm	Ce travail
pILL2157 <i>pgpB</i>		Cm	Ce travail

I. 2. CONDITIONS DE CULTURE DE HP

Les pré-cultures de HP en milieu solides sont démarrées à partir du stock de conservation en glycérol stockées à -80°C, déposées en spot sur un milieu blood agar supplémenté par 10% de sang de cheval et incubé à 37°C pendant 24h en atmosphère microaérophile (6% O₂, 10% CO₂ et 84% N₂). Le milieu de conservation de HP est composé de 25% de glycérol, 38% de milieu liquide *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid®) et 37% d'eau stérile. L'amplification de la pré-culture s'effectue dans les mêmes conditions que celle-ci. Le repiquage du spot de pré-culture est réalisé par prélèvement de celui-ci à l'aide d'un écouvillon stérile et déposé en nappe sur une nouvelle boîte de culture contenant le même milieu que précédemment et incubé à 37°C pendant 24h en atmosphère microaérophile.

Les pré-cultures liquides sont démarrées à partir de la nappe d'amplification et inoculées dans un milieu BHI (Oxoid®) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et incubé toute la nuit à 37°C en atmosphère microaérophile sous agitation. Les cultures liquides de HP sont réalisées à partir de la pré-culture liquide ou directement à partir de la nappe d'amplification suivant les expériences à réaliser dans un milieu BHI (Oxoid®) supplémenté avec 10% SVF et incubé à 37°C en atmosphère microaérophile jusqu'à un DO_{600nm} ~1.0 sous agitation.

Les cultures d'*E. coli* sont cultivées en milieu *Lysogeny Broth* (LB) solide ou liquide avec les antibiotiques correspondant à 37°C en utilisant des conditions standards de croissance.

I. 3. COURBE DE CROISSANCE

Les courbes de croissance réalisées pour les différentes souches de HP sont démarrées à partir d'une pré-culture liquide à DO_{600nm} = 0,05 dans le milieu décrit précédemment. Une densité optique est mesurée toutes les 4 heures jusqu'à 48h. Aucun antibiotique n'est ajouté dans le milieu.

I. 4. EFFICACITE DE TRANSFORMATION CHEZ HP

A partir de nappe d'amplification, une suspension bactérienne de 50µl est réalisée en milieu BHI à une $DO_{600nm} = 20$. 10ng de plasmide Topo TAD/pxE sont ajoutés à cette suspension bactérienne. Ce mélange bactérie/ADN plasmidique est ensuite déposé en spot sur un milieu blood agar non sélectif supplémenté par 10% de sang de cheval et incubé à 37°C en atmosphère microaéroophile pendant 24h. Le spot est ensuite dilué (10^{-1} à 10^{-8}) par dilutions successives en BHI (20µl dans 180µl de BHI). 50µl de la suspension non diluée et 10µl des dilutions 10^{-1} à 10^{-4} sont étalées sur un milieu blood agar supplémenté par 10% de sang de cheval, chloramphénicol (4µg/ml), kanamycine (20µg/ml) and gentamycine (5 µg/ml) ± IPTG 1mM correspondant aux transformants. 10µl des dilutions de 10^{-5} à 10^{-8} sont quant à elles étalées sur un milieu non sélectif blood agar supplémenté par 10% de sang de cheval, chloramphénicol (4µg/ml) et kanamycine (20µg/ml) ± IPTG 1mM correspondant au nombre totale de bactéries. Le nombre de *Colony Forming Unit* (CFU) de toutes les boîtes incubées à 37°C pendant 5 jours en atmosphère microaéroophile sont énumérées. Le taux de transformation est exprimé par le nombre de transformant/CFU/µg d'ADN Topo TAD/pxE.

I. 5. SENSIBILITE A LA POLYMYXINE B

A partir d'une nappe d'amplification, une suspension bactérienne de 2ml est réalisée en eau physiologique à une $DO_{600nm} = 0,75$. Cette suspension est ensuite étalée par inondation sur une gélose Mueller Hinton medium (Difco™) supplémenté avec 10% de SVF et du 2,3,5-chlorure de triphényltétrazolium (TTC, Sigma®) (40µg/ml). Il est très important d'aspirer le surplus de suspension bactérienne et de laisser les boîtes carrées sécher totalement. Tout le liquide a dû être absorbé par la gélose. La polymyxine B (Sigma®) est préparée par dilutions successives au demi (16384µg/ml jusqu'à 0,5µg/ml). 10µl de chaque dilution de polymyxine B sont déposées sur les géloses (12 dilutions par gélose). A cette étape également, il est très important de laisser les boîtes sécher totalement avant de les retourner. Toutes les boîtes sont incubées à 37°C en atmosphère microaéroophile pendant 3 jours. Il peut arriver que la lecture puisse se faire au bout de 2 jours pour

certaines boîtes lorsqu'il y en a beaucoup. Dans ce cas, il est nécessaire de faire une première lecture de toutes les boîtes et les laisser ensuite incuber 24 heures de plus en inversant (les boîtes qui étaient en haut doivent être placées en bas et celles du bas, en haut). Le TTC n'est pas un colorant toxique. Il permet de colorer en rouge les bactéries. Si la polymyxine B a tué les bactéries à cause d'une trop forte concentration, le halo d'inhibition sera alors translucide, si ce n'est pas le cas, cela restera rouge. La CMI est déterminée par la concentration relevée donnant le dernier halo d'inhibition translucide.

I. 6. COLONISATION BACTERIENNE DANS UN MODELE MURIN

Préparation des solutions bactériennes

Il est important de repiquer à nouveau une nappe d'amplification à partir d'une nappe d'amplification à 37°C pendant 24h en atmosphère microaérophile pour que les bactéries soient le plus mobiles possibles.

Le jour de l'infection, à partir de cette 2^{ème} nappe, une suspension bactérienne de 200µl X x ml est réalisée en eau peptonnée stérile à une $DO_{600nm} = 1$, x étant le nombre de souris à infecter. Il est obligatoire de vérifier la mobilité bactérienne de chaque souche servant à infecter les souris. La mobilité est un facteur essentiel à la colonisation de l'estomac. Si ce n'est pas le cas, il faut amplifier à nouveau les souches sur un milieu frais pendant 24h à 37°C en atmosphère microaérophile.

Dénombrement bactérien

Une $DO_{600nm} = 1$ dans la souche de HP X47 correspond à environ $1 \cdot 10^9$ bactéries. Cependant, il peut y avoir certaine variation liée à la mesure de densité optique elle-même ou à la formation d'agrégat bactérien influant directement sur la valeur de densité optique relevée. C'est pourquoi, un dénombrement est obligatoire avant l'infection du nombre de bactéries exactes présentes dans les suspensions réalisées. Ceci a d'autant plus d'importance lors des expériences de compétition afin de vérifier que les proportions qui sont attendues soient bien de 50/50. Pour cela, des dilutions

successives de chaque solution bactérienne sont réalisées de 10^{-1} à 10^{-6} . 50µl de solution non diluée et 10µl de chaque dilution sont étalées sur un milieu blood agar supplémenté par 10% de sang de cheval avec les antibiotiques appropriés pour chaque mutant. Pour les expériences de colonisation, une même suspension est étalée sur milieu sélectif et non sélectif afin de dénombrer les deux espèces bactériennes présentes. Le nombre de CFU de toutes les boites incubées à 37°C pendant 5 jours en atmosphère microaéroophile sont énumérées.

Infections bactériennes chez la souris, sacrifices et prélèvements des estomacs

2. 10^8 bactéries sont administrées par gavage, à l'aide d'une sonde spécifique, à des souris femelles OF1 commandées chez les laboratoires Charles River âgées de 4 semaines. Pour une analyse statistique significative, 7 souris sont infectées pour une même souche et pour un temps de colonisation donné. A bout de 1, 4, 7, 15 et 29 jours les souris sont euthanasiées par CO₂ et la moitié de l'estomac est prélevé, rincé dans de l'eau physiologique stérile et déposé dans un tube spécifique de broyage contenant 500 µl d'eau peptonée stérile préalablement pesé. Les tubes contenant les estomacs sont pesés afin de déterminer le poids exact du prélèvement. Tous les estomacs sont ensuite broyés grâce à un appareil de broyage (GentleMACS™ octo dissociator, Miltenyi Biotec).

Étalement des prélèvements

Les échantillons sont ensuite dilués (10^{-1} à 10^{-3}) et 50µl de prélèvements non dilué et 10µl de chaque dilution sont étalés sur un milieu blood agar supplémenté par 10% de sang de cheval, 200 mg/ml de bacitracine, et 10 mg/ml acide nalidixique, ce qui va inhiber la croissance des bactéries résidentes dans la partie antérieure de l'estomac et 20µg/ml de kanamycine pour les mutants. Lors d'une expérience compétition les prélèvements sont étaler sur un milieu avec et sans 20µg/ml de kanamycine. Le nombre de CFU est énuméré après 5 jours d'incubation à 37°C en atmosphère microaéroophile. Les résultats de 7 souris par souche sont rapportés au nombre de bactéries par gramme d'estomac et analysés statistiquement par un test de Mann-Whitney (GraphPad Prism v5.0 GraphPad Software, CA).

I. 7. PREPARATION DU PGN

Extraction du PGN

L'extraction du PGN de HP a été réalisé suivant un protocole rapide d'extraction de 24h. La croissance en milieu liquide de HP a été arrêtée en phase exponentielle de croissance. Les cultures doivent être suffisamment importante pour qu'après centrifugation et resuspension, il y ait un équivalent de 2 ml de culture à une $DO_{600nm} = 10$. Les culots sont resuspendus dans 1 ml de tampon A (Chlorure de sodium, 1 M) et incubés à 100°C pendant 20 min au bain marie. Après centrifugation (10,000rpm, 5 min), les culots sont lavés 2 fois avec 1,5 ml d'eau ultra pure et resuspendue enfin dans 1 ml d'eau ultra pure. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain d'ultra son pour sonication pendant 30 min. 500µl de solution B (DNase, 15 µg/ml et RNase, 60 µg/ml dans du TRIS, HCl pH 6.8, 0.1 M) sont ajoutés et mis à incuber 1 h à 37°C sous agitation. 500µl de solution C (50 µg/ml trypsine dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés et mis à incuber 1 h à 37°C sous agitation. Les échantillons sont chauffés 3 min à 100°C dans un block chauffant, centrifugés (5 min à 10,000 rpm) et lavés une fois avec 1 ml d'eau ultra pure et centrifugés de nouveau (5 min à 10,000 rpm).

Digestion du PGN à la mutanolysine

Les culots sont resuspendus dans 200µl de tampon de digestion (12,5 mM tampon sodium phosphate à pH 5.6). A 100µl de chaque PGN est ajouté 6µl de mutanolysine 50 U/µl (soit 300U). Les PGN sont incubés à 37°C à 300rpm pendant 14h. 2 µL supplémentaire de mutanolysine (100 U) sont ajoutés et incubés à 37°C à 300 rpm pendant 2h. La digestion est arrêtée par une incubation à 100°C pendant 3 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 20°C à 10,000 rpm pendant 5 min et les surnageants sont transférés dans des tubes de 2ml.

Réduction

50µl d'une solution de NaBH₄ (12 mg dans 1,2 mL de tampon borate 0,5 M dans eau à pH 9) sont ajoutés aux échantillons et incubés à température ambiante sous une sorbonne pendant 30 min.

L'arrêt de la réaction s'effectue avec 3µl d'acide orthophosphorique. Les échantillons réduits sont alors centrifugés à 20°C, 10,000rpm pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS ; Système Dyonex Ultima 3000 couplé à un QExactive Focus de Thermo) utilisant une colonne C18 Hypersyl Gold aQ (150 x 2,1mm avec particules de 1,9µm et un gradient 0-20% acetonitrile dans du 0,1% acide formique).

I. 8. EXTRACTION ET COLORATION DU LPS DE HP

Le protocole suivant a été adapté et optimisé à partir de trois publications différentes Kimura³⁰⁶, Edwards³⁰⁷ et Chaput²¹⁸.

Le LPS est extrait des souches à partir de 10ml de culture liquide dont la croissance a été arrêtée à $DO_{600nm} = 1$. Une fois les cultures centrifugées (7000g, 20min), les culots bactériens sont lavés avec du *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) froid à pH 7,2. L'étape de lavage est répétée une autre fois et le culot est repris dans 1ml de PBS froid à pH 7,2. Les bactéries sont ensuite solubilisées à l'aide d'une solution A composée de Tris HCl, pH 6,8 (0,1875M), Sodium dodécylsulphate (SDS) 6%, glycérol 30% et bleu de bromophénol 0,015%. Les échantillons sont placés à 100°C pendant 5-10min jusqu'à lyse totale des bactéries. A 10µl de ce lysat est ajouté la solution B composée de Tris HCl, pH 6,8 (0,0625M), SDS 0,1%, glycérol 10% et bleu de bromophénol 0,005%. Le mélange est incubé avec de la protéinase K (0,8mg/mL) (MagMAX™, ThermoFischer) et chauffés 3 heures à 65°C pour éliminer toutes traces de protéines. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 min et 10µl sont déposés sur un grand gel SDS/Acrylamide à 12 %. (TGX stain-free™ fast cast™ acrylamide kit 12%). La migration se réalise à 200V pendant 8 heures. L'absence de protéine est vérifiée par Stain free (Gel Doc XR+ molecular imager®, BioRad) qui active les tryptophanes des protéines. Le LPS est alors révélé par une coloration aux nitrates d'argent du kit Pierce® Silver Stain (Thermo Scientific) qui marque les sucres présents.

I. 9. PCR quantitative après rétro-transcription (q-RT-PCR)

Extraction des ARN et purification des échantillons.

Les ARN des différentes souches de HP sont extraits à partir de 10ml de culture liquide arrêtées à $DO_{600nm} = 1$ à l'aide du kit Nucléospin RNA mini® (Machery Nagel) et élués dans 60µL d'H₂O sans RNase. La concentration en ARN est ensuite mesurée par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop®. 10µg d'ARN sont traités à la DNase pour éliminer toute trace d'ADN dans les préparations à l'aide du kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen™). La concentration en ARN est mesurée à nouveau par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop®.

Rétro-transcription (RT)

Les ARN sont ensuite rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit SuperScript® II reverse transcriptase, (Invitrogen™). A 2µg d'ARN, est ajouté un mélange contenant des amorces aléatoires (100ng) et des dNTPs (10µM).

Les échantillons sont incubés 5 min à 65°C puis 5 min à 4°C. Du tampon First-Strand (1X) et 0,1M de dithiothréitol (DTT) sont ajoutés et incubés 2 min à température ambiante. Les échantillons sont alors séparés en 2 tubes de même volume. La SuperScript™ II Retrotranscriptase (RT) (200U) est ajouté dans un des deux tubes et incubées 10 min à température ambiante. Les deux conditions avec et sans rétro-transcription sont incubés 50 min à 42°C puis 15 min à 70°C.

PCR quantitative (q-PCR)

- Détermination des concentrations optimales (amorces et ADN) : Courbes standards

Pour déterminer les concentrations optimales en amorces et en ADN et vérifier la spécificité des amorces, des courbes standards sont réalisées pour chaque couple d'amorce. Une gamme de dilutions d'amorces de 0,1 à 0,4µM et d'ADN génomique de 0 à 10ng sont effectuées.

Les concentrations optimales obtenues pour la mesure de l'expression des gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* et *lpxF* sont de 0,4µM pour les amorces et 5ng pour la quantité d'ADNc.

- **Comparaison des Cycle Threshold (Ct)**

Pour chaque plaque d'échantillon, en plus des échantillons, sont ajoutés 3 trois gènes endogènes (*gyrA*, *ppk* et l'*ARNr 16S*) dont l'expression au sein de chaque mutant et de la souche sauvage a été vérifiée et démontrée comme invariable parmi les différentes souches étudiées.

Le mélange 1 se compose de 12,5µL de Power SYBRGreen® Master Mix (Applied Biosystem™- Life Technology) et 5,5µL de la dilution d'amorce à 0,4µM par puits.

Le mélange 2 se compose de 5ng dilué au 7ème dans de l'eau sans DNase.

Pour chaque puits, il est ajouté 18µl du mélange 1 et 7µl du mélange 2. Chaque condition est réalisée en trois fois au sein d'une même plaque. La plaque est alors incubée dans un thermocycleur spécifique pour la q-PCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems™) suivant le programme 10min à 94°C puis 40 cycles de 15 sec à 94°C et 1 min à 60°C.

I. 10. PREPARATION DES EXTRAITS MEMBRANAIRES

Les extraits membranaires sont réalisés à partir de 200ml de culture liquide dont la croissance a été arrêtée à $DO_{600nm} = 1,8$. Après une centrifugation (6000rpm, 10 min) à 4°C, les surnageants sont décantés et l'excès de liquide est enlevé. Les culots bactériens sont lavés avec 30 ml de tampon Tris-HCl pH 7.4 (20 mM), NaCl (0.2 M) et centrifugés de nouveau (6000rpm, 10 min) à 4°C. Le culot est repris dans 6 ml du même tampon prérefroidi à 4°C. Il est important de bien resuspendre le culot. Les bactéries sont alors soumises à une sonication sur glace (Time 10 min, ON 4 sec, OFF 2 sec, Amplitude 30%), 30 min par souche au total. Ensuite, après une ultra centrifugation (50 000 rpm, 1h) à 4°C, les membranes se retrouvent dans le culot. 2 étapes de lavage sont nécessaires en reprenant la même procédure, ultra centrifugation, reprise du culot dans le tampon. Au dernier lavage, le culot est repris dans 3ml de tampon et du détergent n-Dodecyl β-D-maltoside (DDM) (2%). Les membranes sont alors solubilisées 2 h à 4°C sur une roue.

Une dernière ultra centrifugation (50 000 rpm, 1h) à 4°C est réalisée. Les membranes se retrouvent alors dans le surnageant.

I. 11. COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE CHEZ *E. COLI*

La souche thermosensible *E. coli* BWTsbacA portant la triple invalidation chromosomique des gènes *bacA*, $\Delta ybjG$ et *pgpB* et contenant un plasmide pMAKbacA (CamR) permettant d'exprimer le gène *bacA* dont la réplication est perdue à 42°C a déjà été décrit dans une étude précédente²⁸⁴. Cette souche a été transformée avec différents plasmides pTrc pour évaluer l'activité *in vivo* C₅₅-PP de LpxE, HP0350, HP0851 and LpxF. Les 5 souches d'*E. coli* ont été mis en culture à 30°C dans du milieu liquide LB jusqu'à un DO_{600nm} = 0,5 et diluées jusqu'à 10⁻⁵. 100µl de chaque dilution ont été étalées sur deux boîtes contenant un milieu LB agar et incubées à 30°C et 42°C pendant 16h. Le nombre de CFU est énuméré sur chaque boîte et la complémententation fonctionnelle des mutants thermosensibles est basée sur la comparaison du nombre de CFU entre les deux températures.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I. ARTICLE EN SOUMISSION

Title: HP0851, the main undecaprenyl pyrophosphate phosphatases in *H. pylori* is essential for colonization of the stomach

Elise Gasiorowski^{1,2}, Rodolphe Auger³, Samia Hicham^{1,2}, Sophie Roure³, Martin Douglas⁴, M. Stephen Trent⁴, Dominique Mengin-Lecreulx³, Thierry Touzé³, and Ivo Gomperts Boneca^{1,2*}

* Corresponding author

Email: bonecai@pasteur.fr

Tel: +33 (0)1 44 38 95 16

¹ Institut Pasteur, Unité biologie et génétique de la paroi bactérienne. 28 rue du docteur roux 75015 Paris, France.

² INSERM, Groupe Avenir, 75015 Paris, France

³ Laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques, IBBMC, UMR 8619 CNRS, Université Paris Sud, Orsay Cedex, France

⁴ Department of Infectious Diseases, University of Georgia, Georgia, USA

Keywords

Peptidoglycan – undecaprenyl phosphate – bacterial cell wall – UppP – recycling

Abbreviations

C₅₅-P: undecaprenyl phosphate; C₅₅-PP: undecaprenyl pyrophosphate; UppP: C₅₅-PP phosphatase;

LPS: lipopolysaccharide

Abstract

The biogenesis of bacterial cell-envelope polysaccharides requires the translocation, across the plasma membrane, of sugar sub-units that are produced inside the cytoplasm. To this end, the hydrophilic sugars are anchored to a lipid phosphate carrier (undecaprenyl phosphate (C_{55} -P)), yielding membrane intermediates, which are translocated to the outer face of the membrane. Finally, the glycan moiety is transferred to a nascent acceptor polymer, releasing the carrier in the “inactive” undecaprenyl diphosphate (C_{55} -PP) form. Thus, C_{55} -P is regenerated through the dephosphorylation of C_{55} -PP, itself arising from either *de novo* synthesis or recycling. Two types of integral membrane C_{55} -PP phosphatases were described: BacA enzymes, which constitute a family of phosphatases, and a sub-group of PAP2 enzymes (type 2 phosphatidic acid phosphatases). The human pathogen *Helicobacter pylori* does not contain BacA homologues but has four membrane PAP2 proteins: LpxE, HP0350, HP0851 and LpxF. Further studies have revealed remarkable features of PAP2 enzymes such as multiple substrates and phosphotransferase activities. For example, LpxE and LpxF from *H. pylori* modify lipid A yielding a dephosphorylated form of lipid A that is required for *H. pylori* to survive in the gastric mucosa, by conferring CAMPS resistance and escape to the host immune system. These membrane PAP2 enzymes are essential for the synthesis of various cell wall polymers by the (re)generation of C_{55} -P, but they also participate in the biosynthesis of other lipids such as phosphatidyl glycerol. Here, we report the physiological role of HP0851 via multiple and complementary approaches ranging from a detailed biochemical characterization to the assessment of their impact on cell envelope metabolism and microbe-host interactions. HP0851 showed a dual function as the main UppP and the main phosphatidyl glycerol phosphatase (Pgp) with 90% and 98% of activity, respectively, in *H. pylori*. Although not essential *in vitro*, HP0851 is absolutely required *in vivo* to colonize the stomach. *In vitro*, the remaining UppP activity was carried by LpxE in addition to the 1' phosphatase lipid A already described. It was the only membrane PAP2 able to complement HP0851. These two UppP have crucial roles in the biosynthesis of several cell wall polysaccharides and deciphering these metabolic pathways could be a way to find new therapeutic strategies.

INTRODUCTION

The biogenesis of all the bacterial cell-envelope polysaccharides (peptidoglycan (PGN), lipopolysaccharides (LPS), teichoic acids, enterobacterial common antigen...) requires the translocation, across the cytoplasmic membrane, of glycan units that are produced inside the cytoplasm (**Barreteau *et al.*, 2008**). The hydrophilic sugars must be anchored to a polyisoprenyl lipid phosphate carrier (undecaprenyl phosphate (C_{55} -P)), yielding membrane intermediates, which are translocated to the outer face of the plasma membrane (**Bouhss *et al.*, 2008**). In PGN biosynthesis, these intermediates are transferred, polymerized and cross-linked by transglycosylase and transpeptidase activities of the penicillin-binding proteins (PBPs) to a nascent acceptor polymer. This last step releases the lipid carrier in the “inactive” undecaprenyl pyrophosphate (C_{55} -PP) form which should then be recycled to participate in new rounds of PGN biosynthesis or other bacterial cell-envelope polysaccharides.

C_{55} -P originates from the dephosphorylation of C_{55} -PP, itself arising from either (i) *de novo* synthesis by condensation of eight isopentenyl-pyrophosphate (C_5 -PP) molecules with one farnesyl-pyrophosphate (C_{15} -PP) molecules catalyzed by the essential Upp synthase (UppS) (**Apfel *et al.*, 1999**) in the cytoplasm or (ii) recycling (**Manat *et al.*, 2014**) when it is released in the periplasm. Two unrelated families of proteins exhibiting C_{55} -PP phosphatase (UppP) activity were identified: BacA on one hand and the members of the PAP-2 (type 2 phosphatidic acid phosphatase) superfamily on the other hand. *Escherichia coli* was shown to possess four UppP: a BacA enzyme which represents 75% of the UppP activity and three from the PAP2 superfamily (LpxT, PgpB and YbjG) which represents 25% of the activity (**Ghachi *et al.*, 2004**). The redundancy of activity observed, seems to be shared by most of the bacteria as suggested by a search for putative homologues in databases, raising the question of the significance of such a multiplicity. Interestingly, the deletion of *bacA* together with *ybjG* and *pgpB* was shown to be lethal in *E. coli* whereas any single or double deletions had no effect on bacterial growth. Overexpression of BacA, PgpB or YbjG results in bacitracin resistance, and increases the level of UppP activity in cellular extracts (**Ghachi *et al.*, 2005**). Bacitracin is an antibiotic produced by *Bacillus licheniformis* (**Azevedo *et al.*, 1993**) which strongly binds to C_{55} -PP, inhibiting its dephosphorylation to C_{55} -P and

leading to an arrest of PGN biosynthesis. The establish model is based on an increase of the intracellular pool of C₅₅-P by the overexpression of these UppP, thus overcoming the C₅₅-PP sequestration by the bacitracin. LpxT is not able to complement the triple *bacA-ybjG-pgpB* mutant and its overexpression does not lead to bacitracin resistance. This result suggested that LpxT may have other roles than dephosphorylating C₅₅-PP. In fact, LpxT, was shown to catalyze both *in vitro* and *in vivo* the transfer of the C₅₅-PP distal phosphate group onto lipid A, the lipid moiety of LPS, yielding C₅₅-P and a pyrophosphorylated form of lipid A (Touzé *et al.*, 2008). The significance of this LPS modification remains to be established. However, it suggests a tantalizing general hypothesis that the multiple other C₅₅-PP phosphatases could also exhibit phospho-transferase activities with specific acceptor molecules. In addition of its UppP activity demonstrated *in vitro*, PgpB is involved phospholipids biosynthesis *via* the hydrolysis of phosphatidylglycerol phosphate to phosphatidylglycerol (Icho and Raetz, 1983). Recently, the structure of BacA enzyme from *E. coli* was determined (El Ghachi *et al.*, 2018; Workman *et al.*, 2018) showing an enzyme which is opened to the periplasm. The unique BacA topology close to transporters and channels raised the possibility that BacA has alternate active sites on either side of the membrane and its could function as a flippase.

Helicobacter pylori is a microaerophilic, spiral-shaped, flagellar, Gram-negative bacterium that colonizes the human's gastric mucosa (Marshall and Warren, 1984). *H. pylori* is responsible of chronic gastritis and peptic ulcers (Blaser, 1992) and is a risk factor for gastric cancer. It has been classified as a class I carcinogen by the World Health Organization in 1994. In contrast to *E. coli*, *Helicobacter pylori* does not contain BacA homologues but has four phosphatases from the PAP2 superfamily (HP0021 (LpxE), HP0350, HP0851 and HP1580 (LpxF)). LpxE and LpxF have been previously characterized. These two PAP2 have been shown to be involved in lipid A modifications. In *H. pylori*, the lipid A is unique and constitutively modified. LpxE is responsible for removing the 1 phosphate group. This step is required to add a phosphoethanolamine group on carbon 1 of lipid A (Tran *et al.*, 2004). LpxF is the 4' phosphatase of lipid A modification pathway. These two modifications increase the positive charge of the lipid A. LpxE and LpxF activities are required for *H. pylori* to survive in the gastric mucosa, by conferring cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance and escape to the host immune system (Cullen *et al.*, 2011).

The aim of this study is a to decipher the physiological role of HP0851 *via* multiple and complementary approaches. We describe here, for the first time, that HP0851 is the main UppP in *H. pylori* by biochemical characterization *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, this UppP is also involved in phospholipid biosynthesis catalyzing the dephosphorylation of the phosphatidylglycerol phosphate (PGP) to phosphatidylglycerol like PgpB activity in *E. coli*. In addition, we show that HP0851 has a role in polymyxin B resistance and is essential to colonize the mouse stomach. In a global context of increasing resistance to antibiotics, finding new potential therapeutic targets is crucial especially against *H. pylori* which colonizes half of the world's population. A better understanding of this essential step and of the enzymes involved in this process, could lead to the development of new antibiotics against *H. pylori*.

RESULTS

Specific UppP activities: *in vitro* experiment

To characterize the UppP activity in *H. pylori* and especially two of the uncharacterized PAP2, HP0851 and HP0350, we investigated first, the specific phosphatase activity using C₅₅-PP (50μM) as a substrate. The 4 PAP2 (LpxE, HP0350, HP0851 and LpxF) were cloned on the pTrc H30 expression vector (Table 1). Except for LpxF, the other PAP2 were produced, purified and visualized by commassie on SDS-PAGE (**Figure 1A**). Although LpxF was not readily visible on gel, we proceeded with the purification as for the other three PAP2 and specific UppP activities for all 4 PAP2 were quantified using C¹⁴ radiolabeled substrate. The niche of *H. pylori* is the human stomach where the pH ranges from 2-3 in the lumen to 7 at the epithelial interphase. To mimic these physiological conditions, we measured the activity at a range of pHs and determined (i) if all the PAP2 identified by homology act as a UppP on one hand and (ii) the optimal pH of this activity (**Figure 1B**).

HP0350, an uncharacterized protein, which also possesses the signature of PAP2 superfamily, did not seem to catalyze the C₅₅-PP's dephosphorylation under the conditions tested. In contrast, LpxE acted as an UppP by showing a UppP activity (≈900nmol/min/mg) with an optimal pH between 7 and 8. Interestingly, HP0851 exhibited a very strong UppP activity, 6,7-fold higher than LpxE (≈6000nmol/min/mg) with an optimal pH of 5. *In vitro*, LpxE, in addition of its 1 phosphatase of lipid A showed an UppP activity. In addition, HP0851 seemed to be the main UppP of *H. pylori*, catalyzing the reaction with an optimal pH of 5 close to the pH of the stomach mucus layer.

LpxF was shown to act as a 4' phosphatase of lipid A. Although we could not visualize LpxF after purification, we were able to detect some minimal UppP activity (Table 2 and Figure 1B). This activity is unlikely to come from contaminants since HP0350 was purified using the same methodology and exhibited no activity compared to LpxF.

HP0851 represent 90% of the UppP activity in membranes of *H. pylori*.

To confirm these *in vitro* data, we measured the specific UppP activity in membranes of *H. pylori* wild type N6 strain and the corresponding four single mutants (Δ *lpxE*, Δ *hp0350*, Δ *hp0851* and Δ *lpxF*) (**Figure 2**). Membrane proteins of each single mutant and the wild type strain were extracted from

exponentially growing bacteria and the conversion of the radiolabeled C₅₅-PP to C₅₅-P were measured. The UppP activity in membranes of the *hp0350* and *lpxF* mutants was, identical to the wild type strain. A small but not significant reduction in UppP activity of the *lpxE* mutant was observed. In contrast, in *hp0851* mutant, the UppP activity decreased drastically corresponding to 10% of to the wild type strain. *In vivo*, HP0851 represents 90% of the UppP activity in membranes of *H. pylori*. These data confirmed the *in vitro* quantification of the UppP activity and identify, for the first time, HP0851 as the main UppP of *H. pylori*,

Only LpxE and HP0851 complement the lethal phenotype of a conditional triple mutant in *E. coli*

The UppP of *E. coli* had been studied more intensively and the main UppP of *E. coli*, the BacA enzyme represents 75% of the UppP activity. Furthermore, only a triple mutant *bacA/pgpB/ybjG* is lethal for *E. coli*. The strain BWT*sbacA* is a thermosensitive conditional triple mutant *ΔbacA, ΔybjG, ΔpgpB* in which the expression of *bacA* is impaired at 42 °C. The BWT*sbacA* strain, previously described in (Ghachi *et al.*, 2005), was shown to accumulate soluble peptidoglycan nucleotide precursors and to lyse when grown at the restrictive temperature, due to the depletion of the pool of C₅₅-P and consequent arrest of cell wall synthesis. The ability to PAP2 from *H. pylori* to complement *E. coli* was tested by complementation assay in the BWT*sbacA* strain. Four pTrc plasmids each expressing one of the PAP2 of *H. pylori* (**Table 1**) were transformed into this strain and the complementation at 42°C are tested (**Table 3**). HP0350 and LpxF were not able to complement. LpxE and, in particular, HP0851 complemented the UppP activity of *E. coli*. The biochemical experiments and the complementation assays suggest that LpxE and HP0851 act as the two main phosphatases exhibiting UppP activity in *H. pylori*.

Only LpxE and HP0851 complement the lethal phenotype of a double mutant in *H. pylori*

Next, we tried to construct the *lpxE/hp0851* double mutant because our data suggested that these were the two main UppP in *H. pylori*. We failed to obtain the inactivation of both *lpxE* and *hp0851*. We performed a transformation efficiency experiment in *H. pylori* to test the capacity of each UppP to restore a lethality of the *lpxE/hp0851* double mutant. We constructed four strains deleted for

hp0851 gene carrying an IPTG inducible plasmid (pILL2150) which expressed each one of the PAP2 of *H. pylori*. We transformed these 4 strains with the Topo TA Δ *lpxE* plasmid to replace *lpxE* gene with a gentamycin resistance cassette. The transformed *H. pylori* population was diluted and spread on normal (total number of bacteria) or selective (transformants) plates to measure the transformation efficiency in cfu/ μ g DNA TopoTA Δ *lpxE*. Transformation rates are presented in **Table 4**. LpxF and HP0350 were not able to complement the *lpxE/hp0851* double mutant. Only LpxE and HP0851 were able to complement the *lpxE/hp0851* double mutant in presence of 1mM of IPTG with a transformation rate of $1,44 \cdot 10^{-5}$ and $1,16 \cdot 10^{-5}$ transformants/cfu/ μ g DNA topoTA Δ *lpxE*, respectively. All of these data excluded LpxF and HP0350 as *bona fide* UppP and confirm that only LpxE and in particular HP0851 are the two main UppP in *H. pylori*.

HP0851 is involved in resistance to CAMPs

H. pylori infects the stomach and is able to persist in the mucosa during years. Persistence in its niche requires the expression of an urease enzyme, multiple virulence factors and in particular, high resistant to the CAMPs (**Stead et al., 2010**). To study this particularity aspect, we used polymyxin B as a surrogated for CAMPs (**Gutsmann et al., 2005**). We already know that modifications generated by LpxE and LpxF on lipid A by their 1 and 4' dephosphorylation activities are essentials to resist to different CAMPs such as the polymyxin B and confer to the bacterium a mechanism of escape from the host immune system (**Cullen et al., 2011**). Here, we focused on HP0851 and we investigated its involvement in pathogenicity by (i) measuring the sensitivity to polymyxin B and (ii), the ability of the *hp0851* mutant to colonize the stomach.

We confirmed the increased sensitivity already described in **Cullen et al., 2011** of the *lpxE* and *lpxF* mutants (32 and 128 fold, respectively) compared to *wild type* strain (**Table 5**). The *hp0350* mutant did not play a role in polymyxin B resistance. The sensitivity in *hp0851* mutant was slightly increased by four-fold.

HP0851 and impact on lipid A structure

LpxE and LpxF have an impact on lipid A structure conferring CAMPs resistance to *H. pylori*. We wanted to determine if the four-fold decrease of resistance to polymyxin B in the *hp0851* mutant was

also due to a modification on lipid A. LpxE exhibits UppP activity and acts as a 1 phosphatase of lipid A. We hypothesized that in absence of HP0851, LpxE has to coop with the reduced UppP activity. Thus, LpxE would be limiting to perform efficiently the dephosphorylation of the lipid A. This hypothesis suggests a mixture of lipid A species in *hp0851* mutant with a lipid A phosphorylate in position 1 preventing the addition of the phosphoethanolamine (PE) group and a lipid A with a PE group in position 1. This increased negative charge of the lipid A could be explain the increased sensitivity of the *hp0851* mutant. To test this hypothesis, we extracted the lipid A of three strains, the *wild type*, the single *hp0851* mutant and the *hp0851* mutant complemented by a pILL2150 plasmid expressing HP0851. The lipid A species were analyzed by mass spectrometry to identify the exact structure of the lipid A in these strains. As shown in **Figure 3**, the main form of lipid A for the wild type strain was the tetra-acylated lipid A with a PE group in 1 position and an absence of phosphate group in position 4' as already described. Two additional minor species were observed, a penta-acylated lipid A with PE group in position 1 and without phosphate group in position 4' and a hexa-acylated lipid A with PE and with phosphate group in position 4'. In *hp0851* mutant, the profile of lipid A was similar to the wild type. We conclude that the modest decrease in polymyxin B resistance is independent of any modification of the lipid A.

HP0851 is essential for stomach colonization

The maximum peak of LpxE activity was shown to be at pH 7,4 (**Figure 1**) and it is important to remind that all complementation assays were performed at pH 7. In the mouse colonization assay, the naturel environment of *H. pylori* is mainly at acidic pH. At pH 5, the activity of LpxE drastically decreased by 43 fold (from 900 to 21nmol/ml/mg) (**Table 2**).

Considering the pH spectrum of UppP activity of LpxE, LpxE is predicted to be unable to fully complement the reduced UppP activity in the *hp0851* mutant. The Δ *hp0851* mutation was introduced into the mouse-adapted strain X47. We followed the kinetic of colonization by sacrificing mice after 1, 4, 7, 15 and 32 days of colonization. Seven mice per group were sacrificed in two independent experiments. **Figure 4** illustrates the CFU/g of stomach. The *hp0851* mutant was not able to colonize the stomach neither at early or latter stages of colonization. Thus, HP0851 is essential for stomach colonization.

HP0851 represent 98% of the PGPase activity in membranes of *H. pylori*.

HP0851 is an orthologue of PgpB of *E. coli*, which is a bifunctional enzyme. On one hand, this enzyme acts as a UppP. On the another hand, this protein is involved in phospholipid biosynthesis pathway by dephosphorylating the phosphatidyl glycerol phosphate (PGP) into phosphatidyl glycerol (PG). Next, we were interested in testing the specific activity of HP0851 towards PGP. Using purified membrane fractions, we measured this activity in the membranes of the wild type and the four single mutants (*lpxE*, *hp0350*, *hp0851* and *lpxF*) as for the UppP activity (**Figure 5A**). Surprisingly, we observed a drastic decrease of the PGPase activity in *hp0851* mutant compared to the wild type strain. None of the other PAP2 seemed involved in PGPase activity. Under the conditions tested, HP0851 represented 98% of the PGPase activity in *H. pylori*.

Broad substrate specificity of *H. pylori* PAP2 enzymes

Since the HP0851 and LpxE showed apparently a broad substrate specificity, we further tested other phosphorylated lipid substrates such as C₁₅-PP and C₅-PP (**Figure 5B**). Again HP0350 had no visible activity on any of the tested substrates. HP0851 was the most active phosphatase using all substrates tested except phosphatidic acid (PA). LpxE had similar substrate specificity but with lower activity except for C₅-PP. Finally, LpxF only showed activity towards C₁₅-PP.

PgpB and BacA from *E. coli* complemented UppP activity in *H. pylori*

Since HP0851 has the two specific substrates, the C₅₅-PP and the PGP, we wanted to study the relationship between PgpB of *E. coli* and HP0851. We performed complementation experiments using the same assay described previously to measure the transformation rate in the *lpxE/hp0851* double mutant. We constructed eight strains deleted for *hp0851* gene carrying an IPTG inducible plasmid (pILL2150 or pILL2157) expressing each one of the four UppP from *E. coli* and then we invalidated *lpxE* gene. The transgene is under control of a *H. pylori* promotor in plasmid pILL2157 whereas in the plasmid pILL2150, it is under control of an *E. coli* promotor. Consequently, the transgene on pILL2157 is more expressed in *H. pylori* compared to pILL2150. Note that although the promoter of pILL2157 it is a leaky promoter contrary to the pILL2150 one (**Boneca et al., 2008**) All the transformation rates are summarized in **Table 6**. LpxT and YbjG did not complement the

lack of UppP activity in *H. pylori* whether expressed at low or high levels. At a low level of expression, only PgpB was able to complement the double *lpxE/hp0851* lethal phenotype (1,08. 10⁻⁵ transformants/cfu/μg DNA *topoTAΔlpxE*) in presence of 1mM of IPTG. At a high level of expression BacA and PgpB were both able to complement the double lethal mutation with (5,25. 10⁻⁵ and 2,07. 10⁻⁵ transformants/cfu/μg DNA *topoTAΔlpxE*, respectively). The leaky promoter also supported complementation without IPTG (3,85. 10⁻⁵ and 1,51. 10⁻⁵ transformants/cfu/μg DNA *topoTAΔlpxE*, respectively). BacA enzyme is the main UppP in *E. coli*. Even if BacA does not belong to the PAP2 superfamily, and *H. pylori* does not have UppP from the BacA family, the UppP activity of this enzyme is functional in *H. pylori* at high levels of expression.

DISCUSSION

Recycling of C₅₅-PP by dephosphorylation is an essential pathway to activate the universal lipid carrier, the C₅₅-P. The C₅₅-P is involved in the biosynthesis of many polysaccharides such as peptidoglycan, O-antigen or teichoic acid (Manat *et al.*, 2014). This activation was studied in few bacteria and, in particular, for Gram-negative bacteria, in *E. coli*. In contrast, the activation of the C₅₅-P in *Helicobacter pylori* is poorly understood. Two PAP2 and putative UppP in *H. pylori* (LpxE and LpxF) were previously described shown to dephosphorylate the lipid A (Cullen *et al.*, 2011). The two other UppP from the PAP2 superfamily (HP0851 and HP0350) were uncharacterized until today. HP0851 and HP0350 are orthologues of PgpB of *E. coli* which was described as dual functional enzyme with an UppP activity also involved in the biosynthesis of phospholipids by dephosphorylation of the phosphatidyl glycerol phosphate (Lu *et al.*, 2011).

This study was focused on the characterization of HP0851. We showed, for the first time, *in vitro* and *in vivo*, that HP0851 was the main UppP in *H. pylori* catalyzing the dephosphorylation of the C₅₅-PP into C₅₅-P. We demonstrated that HP0851 was responsible of 90% of the UppP activity with an optimal pH of 5, which is the pH that *H. pylori* faces in the human stomach mucus layer. In addition, we demonstrated by complementation assay that HP0851 was functional in *E. coli* by complementing the *uppP* conditional triple mutant. The deletion of *hp0851* gene was not lethal for *H. pylori* suggesting that one or several others UppP were involved in this activity. Among the three other PAP2, LpxE, HP0350 and LpxF, we showed that only LpxE exhibited an UppP activity (with an optimal pH at 7) and this enzyme was capable of complement the lack of UppP activity in *E. coli uppP* conditional triple mutant. The inactivation of both genes, *lpxE* and *hp0851*, was lethal for *H. pylori* and confirmed by complementation in a conditional mutant that both enzymes were able to complement this lethal phenotype. All these data confirmed that HP0851 and LpxE were the only two UppP functional in *H. pylori*.

In addition, we demonstrated the central role of HP0851 *in vivo*. First, by an uncharacterized mechanism yet, HP0851 appeared important to CAMP resistance. In this study, we excluded changes in the level of lipid A phosphorylation to explain this resistance phenotype. The mass spectrometry results showed no differences in *hp0851* mutant compared to the wild type.

Second, HP0851 was essential for stomach colonization. The hypothesis to explain this phenotype is based on the optimal pH of LpxE. In fact, we showed that LpxE was the only UppP able to complement the UppP activity in absence of HP0851, but its optimal pH was 7. During colonization experiments, LpxE is unlikely to function properly since it was not functional at pH 5 (decreasing of 42 folds of the UppP activity) and thus to complement HP0851. In fact, despite LpxE possessed a dual function as a UppP and the 1 phosphatase on lipid A, *H. pylori* is an acid-tolerant bacterium which means that *H. pylori* cannot survive during a long time in the acidic pH of the human stomach lumen (pH around 2). The first step of the stomach colonization is dependent on its motility and urease enzyme (Smoot *et al.*, 1990). *H. pylori* escapes from the lumen to the mucus layer and is capable to buffer the pH of its environment. We cannot exclude a relevant physiological role of LpxE in dephosphorylation of the C₅₅-PP into C₅₅-P after the first step of colonization once *H. pylori* reaches its niche the mucus layer and the epithelial surface. Our previous work on LpxE showed that indeed LpxE is needed for long-term colonization. However, this is likely due to its role as lipid 1P phosphatase and escape to TLR4 signaling rather than an UppP since the mutant was able to colonize TLR4 KO mice (Cullen *et al.*, 2011).

Interestingly, this study also highlighted the dual function of HP0851. In fact, we described another substrate specificity for HP0851 related to the biosynthesis of phospholipids. HP0851 acted as PgpB from *E. coli* catalyzing 98% of the conversion of the phosphatidyl glycerol phosphate into phosphatidyl glycerol. By sequence homology, only one putative phosphatidyl glycerol phosphatase (Pgp) was found in *H. pylori*, PgpA (HP0737). A global transposon analysis of *H. pylori* genome described *pgpA* as an essential gene (Salama *et al.*, 2004) but we confirmed by replacing the *pgpA* gene with a resistance cassette that *pgpA* gene was non-essential (data not shown). This enzyme could account for the remaining 2% of Pgp activity in *H. pylori*. In *E. coli*, three Pgp were already described, PgpA, PgpB and PgpC and only a triple mutant was lethal (Lu *et al.*, 2011). Even if the composition of phospholipids differs between *E. coli* and *H. pylori* with half of phosphatidyl glycerol (25% against 12,5%, respectively) (Raetz, 1978; Hirai *et al.*, 1995) we could expect that a *pgpA/hp0851* double mutant to be lethal for *H. pylori*.

H. pylori has the particularity to exist as a rod-spiral shaped bacterium and as a coccoid form. The coccoid forms have been a matter of controversy as to what is their physiological role. It has suggested

to be persistence forms of *H. pylori*. Phosphatidyl glycerol is important for coccoid formation in *H. pylori*. During this transition, there is a decrease of phosphatidyl glycerol correlated by the increasing of cardiolipin (**Shimomura *et al.*, 2004**). Cardiolipin comes from the condensation of two phosphatidyl glycerol molecules catalyzed by the putative cardiolipin synthase (HP0190). Cardiolipin is important to increase membrane curvature as it occurs during coccoid transition. If the synthesis of phosphatidyl glycerol is reduced in *hp0851* mutant, we could hypothesize that the conversion into coccoid form will be altered.

Finally, the involvement of HP0851 in phospholipid biosynthesis could explain the decrease of resistance to polymyxin B. This CAMP forms pores in the cytoplasmic membrane leading cytoplasmic leakage. If the composition of phospholipids is altered in the *hp0851* mutant, particularly with an accumulation of PGP, the membrane net negative charge might increase favoring pore formation by CAMPs. Future work aimed at analyzing the membrane composition will allow to test this hypothesis.

Although LpxE has similar substrate specificity, on top of its bona fide lipid A 1P phosphatase activity, in this report, we described HP0851 for the first time as the main UppP and Pgp in *H. pylori*. This protein was essential for colonization probably due to its multifunctional and central role in several lipid biosynthetic pathways suggesting that HP0851 is the sole enzyme capable to support C55-PP recycling in its natural niche. Hence, the UppP family of enzymes constitute a bona fide new target for new therapeutic strategies against bacteria and in particular against *H. pylori*, which is becoming increasing resistant to the existing antibiotic arsenal.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and plasmids used in this study and culture conditions.

The bacterial strains and plasmids used in the study are summarized in **Table 1**. Precultures of *H. pylori* were started from glycerol stocks routinely stored at -80°C , plated onto 10% horse blood agar medium and incubated at 37°C for 24h in a microaerobic atmosphere (6% O_2 , 10% CO_2 , 84% N_2). The glycerol storage media is composed of 25% of glycerol, 38% of Brain Heart Infusion liquid (BHI) (Oxoid[®]) and 37% of sterilized water. Amplification of the preculture was performed in the same conditions such as precultures in new plates at 37°C for 24h in a microaerobic atmosphere. Liquid precultures were started from amplification plates and inoculated into BHI (Oxoid[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) incubated at 37°C overnight in a microaerobic atmosphere. Liquid cultures of *H. pylori* were started from overnight liquid culture and inoculated into BHI (Oxoid[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum. In general, liquid cultures of *H. pylori* were grown to an $OD_{600\text{nm}}$ of ~ 1.0 at 37°C under microaerobic conditions with shaking. *E. coli* was routinely grown at 37°C in LB broth with appropriate antibiotics using standard conditions.

C₅₅-PP and PGP phosphatase assays

To measure UppP and PGP phosphatase activity in membranes: *H. pylori* cultures (200 ml) were harvested at $OD_{600\text{nm}} = 1.0$ and centrifuged. Cell free extracts, membrane free cytosol, and washed membranes were prepared as previously described (**Stead *et al.*, 2010**).

To measure *in vitro* UppP activity, we used purified proteins. The PAP2 were cloned in the pTrcHis30 vector and purified using a Ni^{2+} -NTA column as previously described for *E. coli* BacA (**Ghachi *et al.*, 2004**). The C₅₅-PP and PGP phosphatase assays were carried out in a 10 μl reaction mixture containing 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM β -mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 0.2 % DDM, 50 μM [¹⁴C]C₅₅-PP or 50 μM [¹⁴C]PGP (900 Bq) and enzyme. Appropriate dilutions of purified phosphatases, or of membrane extracts, were used to achieve less than 30% substrate hydrolysis. The reaction mixture was incubated at 37°C for 10 min with purified proteins or for 30 min with membrane extracts and the reaction was stopped by freezing in liquid nitrogen. The substrates and

products were then separated and quantified by TLC analysis, as previously described for C₅₅-PP (Ghachi *et al.*, 2004) and PGP (Lu *et al.*, 2011) hydrolysis.

When the phosphatase activity was investigated at various pH values, buffering was achieved in sodium acetate (pH 3–7), Tris-HCl (pH 7–9) or sodium carbonate buffer (pH 9–11).

The phosphatase activity towards other non-radiolabeled substrates [C₅-PP, C₁₅-PP, diacyl(C8) glycerol-PP (DGPP), phosphatidic acid (PA)] was determined by measuring the amount of released inorganic phosphate during catalysis. The reaction mixture was as described above with 50 μM substrate in a final volume of 50 μl. After 10 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 100 μl of Malachite green solution (Biomol green™, Enzo Life Sciences), and the released phosphate was quantified by measurement of the absorbance at 620 nm.

Functional complementation in *E. coli*

The *E. coli*-thermosensitive strain BWT*sbacA* carrying a triple chromosomal gene deletion ($\Delta bacA \Delta ybjG \Delta pgpB::kanR$) and harboring a *bacA*-expressing plasmid pMAK*bacA* (CamR) whose replication is impaired at 42 °C has been previously described (Ghachi *et al.*, 2005). The *E. coli* mutant strains BWT*sbacA* was transformed by the various pTrc plasmids to be evaluated for *in vivo* C₅₅-PP activity of LpxE, HP0350, HP0851 and LpxF. Isolated transformants were subcultured at 30°C in liquid LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin and, when the absorbance reached 0.5, the cultures were diluted to 10⁻⁵ and aliquots were plated onto two ampicillin-LB agar plates which were incubated at either 30 °C or 42°C for 24 h. The CFU were numerated on each plate and the functional complementation of the thermosensitive mutants was based on the comparison of the CFUs obtained at the two temperatures.

Transformation rate

Precultures of *H. pylori* were started from glycerol stocks routinely stored at –80°C, plated onto 10% horse blood agar medium and incubated at 37°C for 24h in a microaerobic atmosphere (6% O₂, 10% CO₂, 84% N₂). Amplification of the pre-culture was performed in the same conditions such as pre-cultures in new plates at 37°C for 24h in a microaerobic atmosphere. 50μl of suspension in BHI at OD_{600nm} = 20 were made until the amplification plate and mixed with 10ng of Topo TAA*lpxE*

plasmid. All the mix was put on a non-selective plate onto 10% horse blood agar medium and incubated at 37°C for 24h in a microaerobic atmosphere. The transformation spot was then diluted (10^{-1} at 10^{-8}). 50µl of the non-diluted suspension and 10µl of the 10^{-1} at 10^{-4} dilutions were spread on 10% horse blood agar medium supplemented with chloramphenicol (4µg/ml), kanamycin (20µg/ml) and gentamycin (5 µg/ml) ± IPTG 1mM to estimate the number of transformants. The 10^{-5} at 10^{-8} dilutions were spread in non-selective plate which contain 10% horse blood agar medium supplemented by chloramphenicol (4µg/ml), kanamycin (20µg/ml) ± IPTG 1mM to estimate the total bacteria. The CFU of all plates incubated at 37°C for 5 days in a microaerobic atmosphere were enumerated. The transformation rate was express by the number of transformant/total cfu/µg of DNA TopoTAAΔlpxE.

Sensitivity to polymyxin B

Strains were grown routinely on amplification plates. Two ml of suspension in 0,9% NaCl at $OD_{600nm} = 0,75$ were made from the amplification plates and spread by inundation onto Mueller Hinton medium (Difco™) supplemented 10% of FBS and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma®) (40µg/ml). Polymyxin was diluted by successive dilutions of two (16384µg/ml until 0,5µg/ml). When the square plates were dried, 10µl of each dilution of polymyxin B was put on plates and allowed to dry. All plates were incubated at 37°C for 3 days in a microaerobic atmosphere. TTC is a non-toxic dye which colors in red the alive bacteria. CMI's were determined by the lowest concentration leading to a translucent halo of inhibition.

Colonization

OF1 female mice purchased from Charles River Laboratories aged 5 weeks were infected by gavage with feeding needles with X47 strain ($2 \cdot 10^8$ bacteria per mouse). Colonization rates were determined after 1, 4, 7 15 32 days by enumeration of colony forming units (CFU) per gram of stomach. Mice were euthanized with CO₂ and the stomachs were ground and homogenized in peptone broth. The samples were then diluted and spread on blood agar plates supplemented with 200 mg/ml of bacitracin, and 10 mg/ml of nalidixic acid, to inhibit the growth of resident bacteria from the mouse

forestomach and 20µg/ml of kanamycin for *hp0851* mutant strain. The CFUs were enumerated after 5 days of incubation under microaerobic conditions. The results of two independent colonization experiments (seven mice by cage) were pooled and a one tailed Mann–Whitney test was used to determine statistical significance of observed differences (GraphPad Prism v5.0 GraphPad Software, CA). Animal experiments were done according to European (Directive 2010/63 EU) and French regulation (Décret 2013-118) under the authorized protocol CETEA 2014-072 reviewed by the Institut Pasteur Ethical Committee (registered as number 89 with the French Ministry of Research). The experimental protocol was also approved by the French Ministry of Research under the number APAFIS#11694-2017100510327765 v2.

Isolation of Lipid A for mass spectrometry analysis

H. pylori cultures were grown in the to an $OD_{600nm} = 1,0$ using standard liquid growing conditions described above and the cells harvested by centrifugation. Lipid A was purified from bacteria as described previously (Tran *et al.*, 2004) and stored frozen at -20°C. The lipid A species were analyzed using a MALDI-TOF (ABI Voyager-DEPRO) mass spectrometer equipped with a N2 laser (337nm) using a 20 Hz firing rate. The spectra were acquired in negative ion reflecton mode and each spectrum represented the average of a minimum of 4000 shots. The matrix used was a saturated solution of 6-aza-2-thiothymine in 50% acetronitrile and 10% tribasic ammonium citrate (9:1, v/v). The samples were dissolved in chloroform-methanol (4:1, v/v) and deposited on the sample plate, followed by an equal portion of matrix solution (0,3µl).

ACKNOWLEDGMENTS

REFERENCES

- Apfel, C.M., Takács, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., and Keck, W. (1999) Use of Genomics To Identify Bacterial Undecaprenyl Pyrophosphate Synthetase: Cloning, Expression, and Characterization of the Essential *uppS* Gene. *J Bacteriol* **181**: 483–492.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Campos-Takaki, G.M. (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* **42**: 1–7.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 168–207.
- Behrens, W., Bönig, T., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2012) Genome sequence of *Helicobacter pylori* hpEurope strain N6. *J Bacteriol* **194**: 3725–3726.
- Blaser, M.J. (1992) Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* **102**: 720–727.
- Boneca, I.G., Ecobichon, C., Chaput, C., Mathieu, A., Guadagnini, S., Prévost, M.-C., *et al.* (2008) Development of Inducible Systems To Engineer Conditional Mutants of Essential Genes of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2095–2102.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 208–233.
- Cullen, T.W., Giles, D.K., Wolf, L.N., Ecobichon, C., Boneca, I.G., and Trent, M.S. (2011) *Helicobacter pylori* versus the Host: Remodeling of the Bacterial Outer Membrane Is Required for Survival in the Gastric Mucosa. *PLoS Pathog* **7**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245313/>. Accessed July 16, 2018.
- El Ghachi, M., Howe, N., Huang, C.-Y., Olieric, V., Warshamanage, R., Touzé, T., *et al.* (2018) Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis. *Nat Commun* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5852022/>. Accessed July 12, 2018.
- Ghachi, M.E., Bouhss, A., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004) The *bacA* Gene of *Escherichia coli* Encodes an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase Activity. *J Biol Chem* **279**:

30106–30113.

Ghachi, M.E., Derbise, A., Bouhss, A., and Mengin-Lecreulx, D. (2005) Identification of Multiple Genes Encoding Membrane Proteins with Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase (UppP) Activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 18689–18695.

Gutsmann, T., Hagge, S.O., David, A., Roes, S., Böhling, A., Hammer, M.U., and Seydel, U. (2005) Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* **11**: 167–173.

Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T., and Oguma, K. (1995) Unique cholesteryl glucosides in *Helicobacter pylori*: composition and structural analysis. *J Bacteriol* **177**: 5327–5333.

Icho, T., and Raetz, C.R. (1983) Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol* **153**: 722–730.

Lu, Y.-H., Guan, Z., Zhao, J., and Raetz, C.R.H. (2011) Three Phosphatidylglycerol-phosphate Phosphatases in the Inner Membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **286**: 5506–5518.

Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2014) Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microb Drug Resist* **20**: 199–214.

Marshall, B., and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* **323**: 1311–1315.

Raetz, C.R. (1978) Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **42**: 614–659.

Salama, N.R., Shepherd, B., and Falkow, S. (2004) Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **186**: 7926–7935.

Shimomura, H., Hayashi, S., Yokota, K., Oguma, K., and Hirai, Y. (2004) Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 407–413.

Smoot, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., and Resau, J.H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **58**: 1992–1994.

Stead, C.M., Zhao, J., Raetz, C.R.H., and Trent, M.S. (2010) Removal of the outer Kdo from

Helicobacter pylori lipopolysaccharide and its impact on the bacterial surface. *Mol Microbiol* **78**: 837–852.

Touzé, T., Tran, A.X., Hankins, J.V., Mengin-Lecreulx, D., and Trent, M.S. (2008) Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol Microbiol* **67**: 264–277.

Tran, A.X., Karbarz, M.J., Wang, X., Raetz, C.R.H., McGrath, S.C., Cotter, R.J., and Trent, M.S. (2004) Periplasmic Cleavage and Modification of the 1-Phosphate Group of *Helicobacter pylori* Lipid A. *J Biol Chem* **279**: 55780–55791.

Veyrier, F.J., Ecobichon, C., and Boneca, I.G. (2013) Draft Genome Sequence of Strain X47-2AL, a Feline *Helicobacter pylori* Isolate. *Genome Announc* **1**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868871/>. Accessed August 4, 2018.

Workman, S.D., Worrall, L.J., and Strynadka, N.C.J. (2018) Crystal structure of an intramembranal phosphatase central to bacterial cell-wall peptidoglycan biosynthesis and lipid recycling. *Nat Commun* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5861054/>. Accessed July 12, 2018.

Strains	Genotype	Resistance	Reference
<i>E. coli</i>			
BWTsbacA	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB</i> ::Kan + pMAK <i>bacA</i>		(Ghachi <i>et al.</i> , 2005)
BWTsbacA + pTrclpxE	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB</i> ::Kan + pMAK <i>bacA</i> + pTrclpxE		This work
BWTsbacA + pTrchp0350	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB</i> ::Kan + pMAK <i>bacA</i> + pTrchp0350		This work
BWTsbacA + pTrchp0851	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB</i> ::Kan + pMAK <i>bacA</i> + pTrchp0851		This work
BWTsbacA + pTrclpxF	BW25113 <i>bacA ybjG pgpB</i> ::Kan + pMAK <i>bacA</i> + pTrclpxF		This work
<i>H. pylori</i>			
N6	N6		(Behrens <i>et al.</i> , 2012)
HP-2	N6 <i>lpxE</i> ::Genta	Genta	This work
HP-3	N6 <i>hp0350</i> ::Kan	Kan	This work
HP-4	N6 <i>lpxF</i> ::Kan	Kan	This work
HP-13	N6 <i>hp0851</i> ::Kan	Kan	This work
HP-5	N6 +pILL2150	Cm	This work
HP-7	N6 +pILL2150 <i>bacA</i>	Cm	This work
HP-8	N6 +pILL2150 <i>lpxT</i>	Cm	This work
HP-9	N6 +pILL2150 <i>pgpB</i>	Cm	This work
HP-10	N6 +pILL2150 <i>ybjG</i>	Cm	This work
HP-14	N6 + pILL2150 <i>lpxE</i>	Cm	This work
HP-15	N6 + pILL2150 <i>hp0350</i>	Cm	This work
HP-16	N6 + pILL2150 <i>lpxF</i>	Cm	This work
N6 +pILL2157 <i>bacA</i>	N6 +pILL2157 <i>bacA</i>	Cm	This work
N6 +pILL2157 <i>lpxT</i>	N6 +pILL2157 <i>lpxT</i>	Cm	This work
N6 +pILL2157 <i>pgpB</i>	N6 +pILL2157 <i>pgpB</i>	Cm	This work
X47	X47-2AL		(Veyrier <i>et al.</i> , 2013)
HP-46	X47 <i>hp0851</i> ::KanR	Kan	This work
	N6 <i>hp0851</i> ::KanR + pILL2150 <i>lpxE</i>	Kan, Cm	This work
	N6 <i>hp0851</i> ::KanR + pILL2150 <i>hp0350</i>	Kan, Cm	This work
	N6 <i>hp0851</i> ::KanR + pILL2150 <i>hp0851</i>	Kan, Cm	This work
	N6 <i>hp0851</i> ::KanR + pILL2150 <i>lpxF</i>	Kan, Cm	This work
	N6 <i>hp0851</i> ::KanR + pILL2150		
Plasmids			
Topo TAA <i>lpxE</i>		Genta	This work
pTrclpxE	pTrc99 <i>lpxE</i>	Amp	This work
pTrcHis <i>lpxE</i>	pTrcHis30 <i>lpxE</i>	Amp	This work
pTrchp0350	pTrc99 <i>hp0350</i>	Amp	This work
pTrcHis <i>hp0350</i>	pTrcHis30 <i>hp0350</i>	Amp	This work
pTrchp0851	pTrcHis30 <i>hp0851</i>	Amp	This work
pTrclpxF	pTrc99 <i>lpxF</i>	Amp	This work
pTrcHis <i>lpxF</i>	pTrcHis30 <i>lpxF</i>	Amp	This work
pILL2150 <i>lpxE</i>		Cm	This work
pILL2150 <i>hp0350</i>		Cm	This work
pILL2150 <i>hp0851</i>		Cm	This work
pILL2150 <i>lpxF</i>		Cm	This work

pILL2150 <i>bacA</i>	Cm	This work
pILL2150 <i>lpxT</i>	Cm	This work
pILL2150 <i>pgpB</i>	Cm	This work
pILL2150 <i>ybjG</i>	Cm	This work
pILL2157 <i>bacA</i>	Cm	This work
pILL2157 <i>lpxT</i>	Cm	This work
pILL2157 <i>pgpB</i>	Cm	This work

Table 1: Bacterial strains and plasmids used in this study. Genta: Gentamycin resistance cassette; Kan: Kanamycin resistance cassette; Cm: Chloramphenicol resistance cassette; Amp: Ampicillin resistance cassette.

UppP specific Activity (nmol/min/mg)

pH	LpxE	HP0350	HP0851	LpxF
3	10	0,08	131	30,8
4	13,8	0,33	1227	97,2
5	21,3	1,21	6039	130,3
6	291,3	1	4616	97,5
7	671,3	0,79	3755	91,8
7	735	1	4157	84,8
7,4	900	1,05	3493	71,5
8	492,5	0,84	2528	48,8
9	285	0,5	1180	28,7
9	76,3	0,25	974	20,5
10	0	0,04	159	9
11	8,8	0	19	4,2

Table 2: UppP specific activity from *H. pylori*.

Dilutions of purified UppP were used and the UppP specific activity corresponded to the UppP activity normalized by the quantity of proteins. We used a large spectrum of pH to determine the optimal pH for each UppP from *H. pylori*. Values framed in red corresponded approximately to the pH in human stomach.

<i>E. coli</i> BWTsbacA	CFU/ml	
	30°C	42°C
-	2320	3
+pTrclpxE	1392	456
+pTrchp0350	1168	2
+pTrchp0851	1780	1628
+pTrclpxF	1804	5

Table 3: Functional complementation assay UppP from *H. pylori* in the BWTsbacA thermosensitive triple mutant of *E. coli*. The number of CFU was measured for 30°C and 42°C.

<i>Helicobacter pylori</i> N6 $\Delta hp0851$	Transformation rate (transformants/cfu/ μ g DNA <i>topoTA</i> $\Delta lpxE$)	
	-IPTG	+IPTG (1mM)
+pILL2150 empty	0	0
+pILL2150 <i>lpxE</i>	0	1,44E-05
+pILL2150 <i>hp0350</i>	0	0
+pILL2150 <i>hp0851</i>	0	1,16E-05
+pILL2150 <i>lpxF</i>	0	0

Table 4: Quantification of the transformation rate of the *lpxE* gene inactivation in $\Delta hp0851$ single mutant of *H. pylori* with plasmids expressing each one of the PAP2 from *H. pylori*. The transformation rate was measure in presence or absence of 1mM of IPTG.

<i>H. pylori</i> N6 strain	Polymyxin B MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Fold change vs WT strain
<i>Wild Type</i>	2048 \pm 0	-
$\Delta\textit{lpxE}$	64 \pm 0	32
$\Delta\textit{hp0350}$	2048 \pm 0	=
$\Delta\textit{hp0851}$	512 \pm 0	4
$\Delta\textit{lpxF}$	16 \pm 0	128

Table 5: Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of polymyxin of *H. pylori* strains. MIC are reported as $\mu\text{g/ml}$ and are the average of three experiments using Polymyxin B (Sigma[®]).

<i>Helicobacter pylori</i> N6 $\Delta hp0851$	Transformation rate (transformants/cfu/ μ g DNA <i>topoTA</i> Δ <i>lpxE</i>)	
	-IPTG	+IPTG (1mM)
+piLL2150 empty	0	0
+piLL2150 <i>bacA</i>	0	0
+piLL2150 <i>lpxT</i>	0	0
+piLL2150 <i>pgpB</i>	0	1,08E-05
+piLL2150 <i>ybjG</i>	0	0
+piLL2157 <i>bacA</i>	3,85E-05	5,25E-05
+piLL2157 <i>lpxT</i>	0	0
+piLL2157 <i>pgpB</i>	1,51E-05	2,07E-05

Table 6: Quantification of the transformation rate of the *lpxE* gene inactivation in $\Delta hp0851$ single mutant of *H. pylori* with plasmids expressing each one of the UppP from *E.*. Two types of plasmids were used: pILL2150 and pILL2157. pILL2150 has a *E. coli* promotor and leads to low levels of expression in *H. pylori*. pILL2157 has a *H. pylori* promotor leading to high levels of expression in *H. pylori*. The transformation rate was measure in presence or absence of 1mM of IPTG.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: C₅₅-PP activity of *H. pylori*'s UppP and impact of the pH

(A) SDS-PAGE of the purified recombinant PAP2 proteins of *H. pylori*. (B) LpxE (black), HP0350 (blue), HP0851 (brown) and LpxF (red) phosphatase activity are represented in function of the pH with a radiolabeled [¹⁴C]C₅₅-PP as a substrate. The substrates and products were separated and quantified by TLC analysis. The same results are indicated in detail in Table 2

Figure 2: UppP activity in membranes of *H. pylori*

The UppP activity of the wild type and the four single mutants of *H. pylori* N6 strain was measured and normalized by the quantity of proteins in membrane extracts. Ratios were then normalized to the wild type strain.

Figure 3: Mass spectrometry analysis of purified lipid A of *hp0851* mutant. Lipid A was isolated from wild type, *hp0851* mutant and complemented strain in strain N6 and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry in the negative-ion mode. The relative abundance of lipid A species were shown in the second column and the corresponding lipid A species, in the third column.

Figure 4: *In vivo* colonization of the *hp0851* mutant in strain X47 at day 1, 4, 7, 15 and 32 using OF1 mice.

OF1 mice were infected orogastrically with the indicated strains at 2×10^8 bacteria per mouse. Colonization rates were determined after 1 (A), 4 (B), 7 (C) 15 (D) and 32 (E) days by enumeration of colony forming units per gram (CFU/g) of stomach. Circles and square represent individual mice while mean colonization levels are illustrated by horizontal bars. Circles and square located on the x-axis represent mice with no colonization. The single *hp0851* mutant showed a statistically significant colonization defect at day 4, 7, 15 and 32 when compared to wild type as indicated by a red asterisk (* $p < 0.05$; *** $p < 0,001$). Data from two independent cohorts of mice were combined to increase significance and robustness of our analysis.

Figure 5: PGP phosphatase activities in membranes of *H. pylori*

The PGP phosphatase activity of the wild type and the four single mutants of *H. pylori* N6 strain was measured and normalized by the quantity of proteins in membrane extracts (A). Ratios were then normalized by *the wild type* strain. (B) The phosphatase activity towards other non-radiolabeled substrates [C₅-PP, C₁₅-PP, DGPP, PA] was determined by measuring the amount of released inorganic phosphate during catalysis.

FIGURE 1

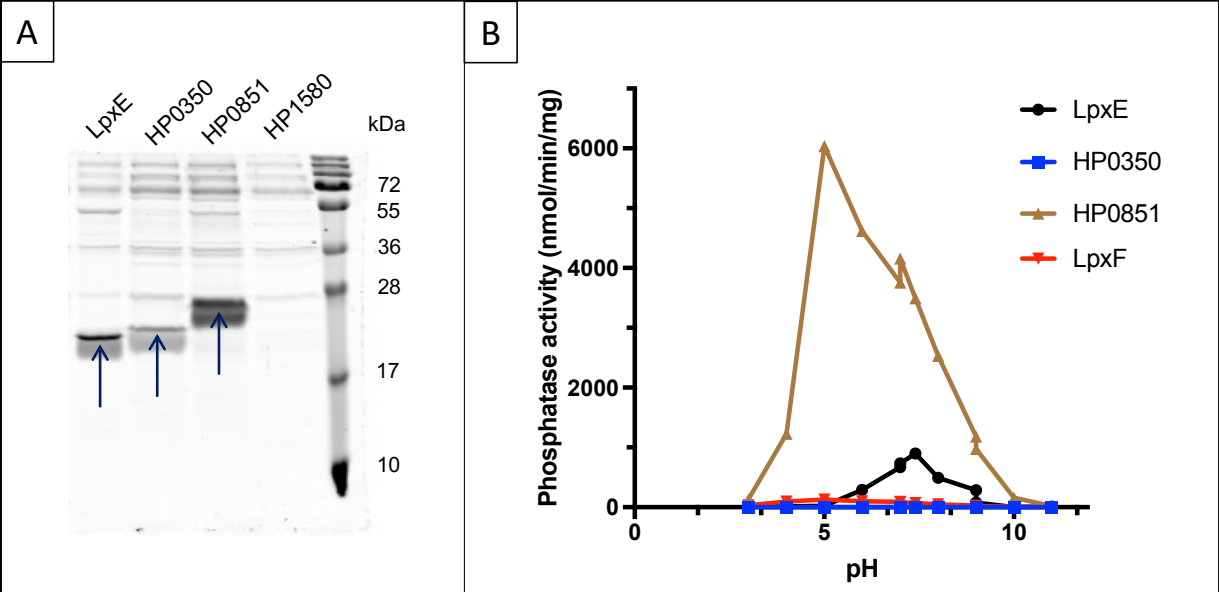


FIGURE 2

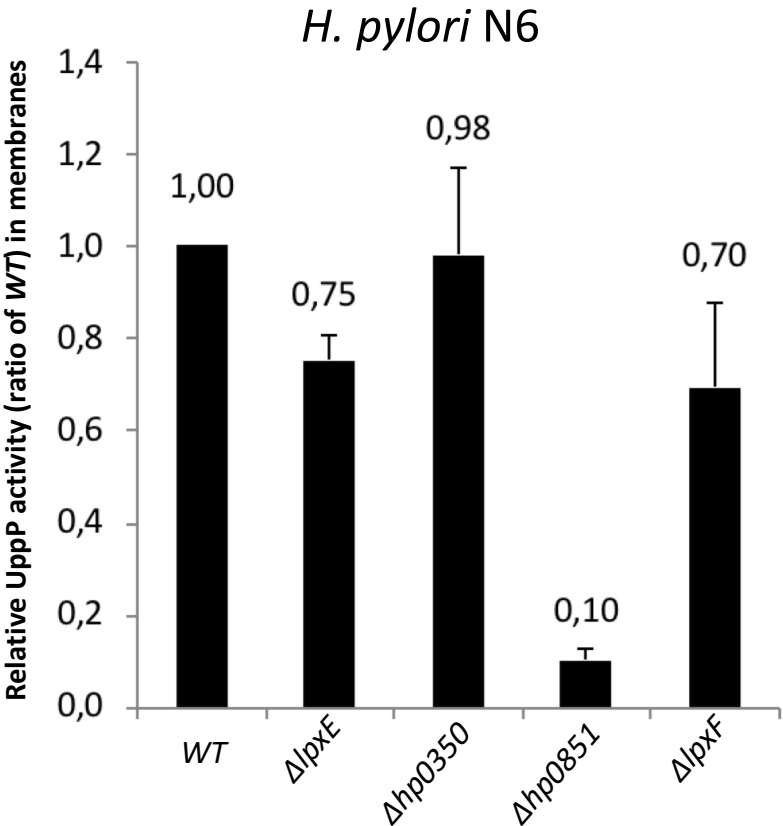


FIGURE 3

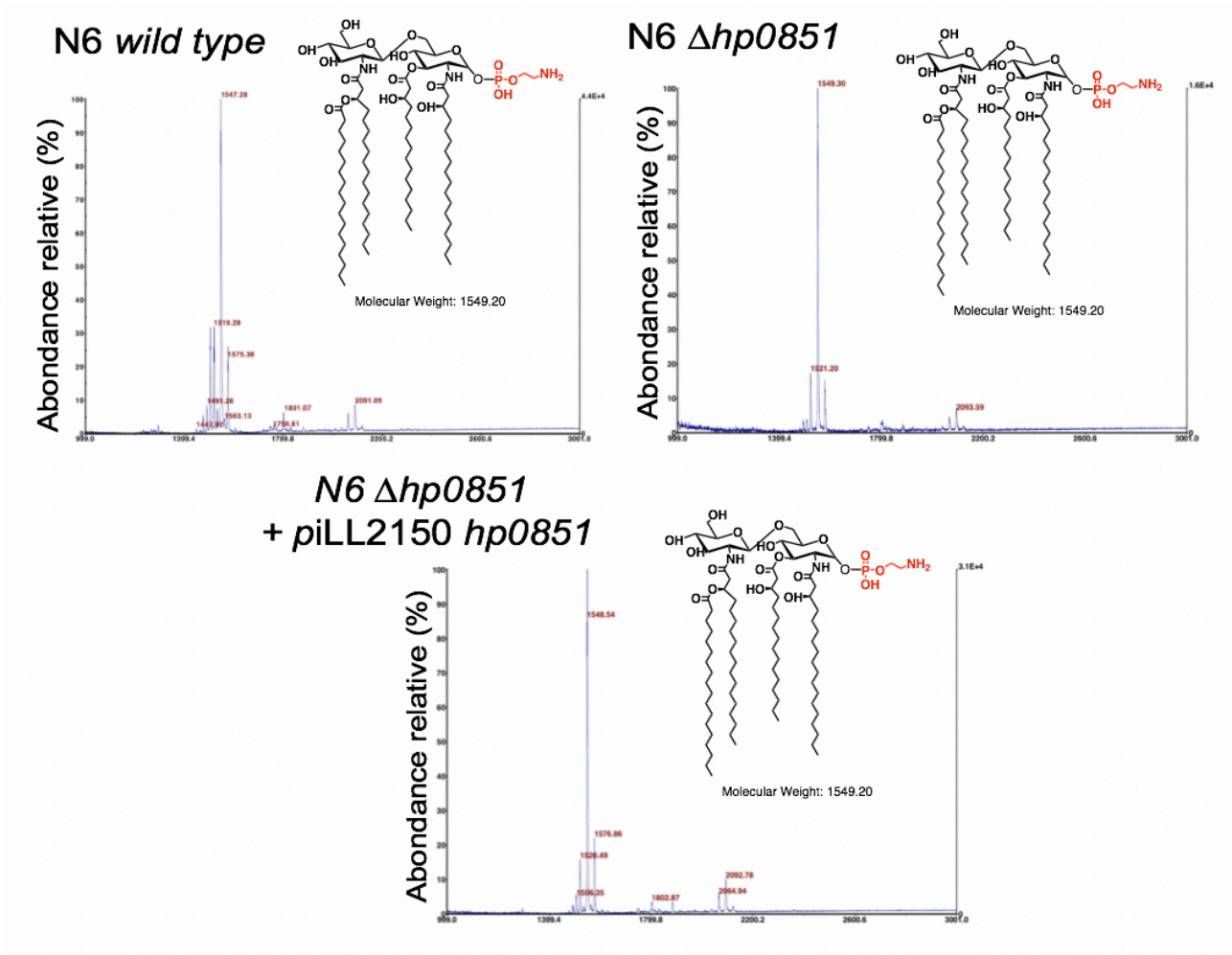


FIGURE 4

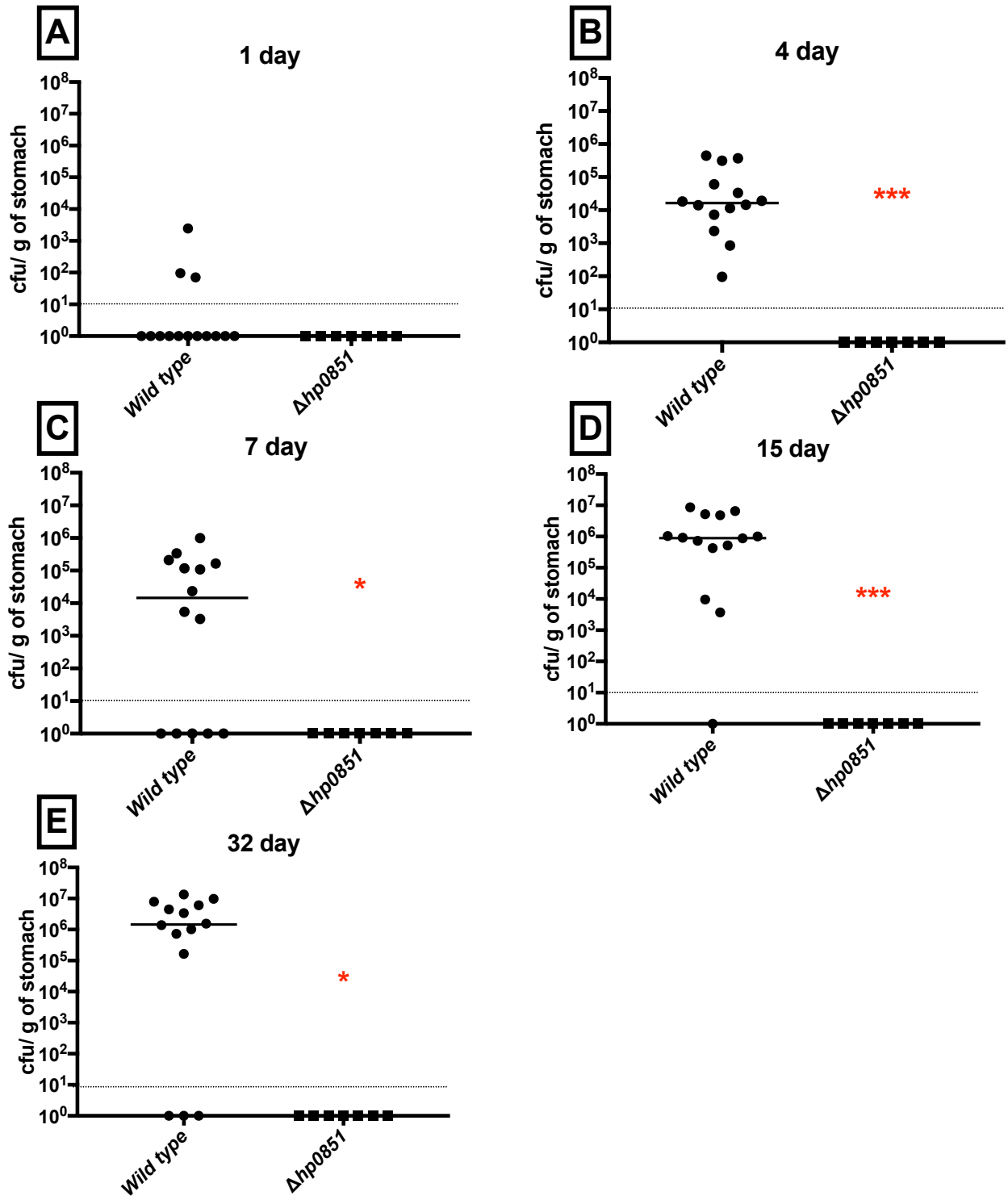
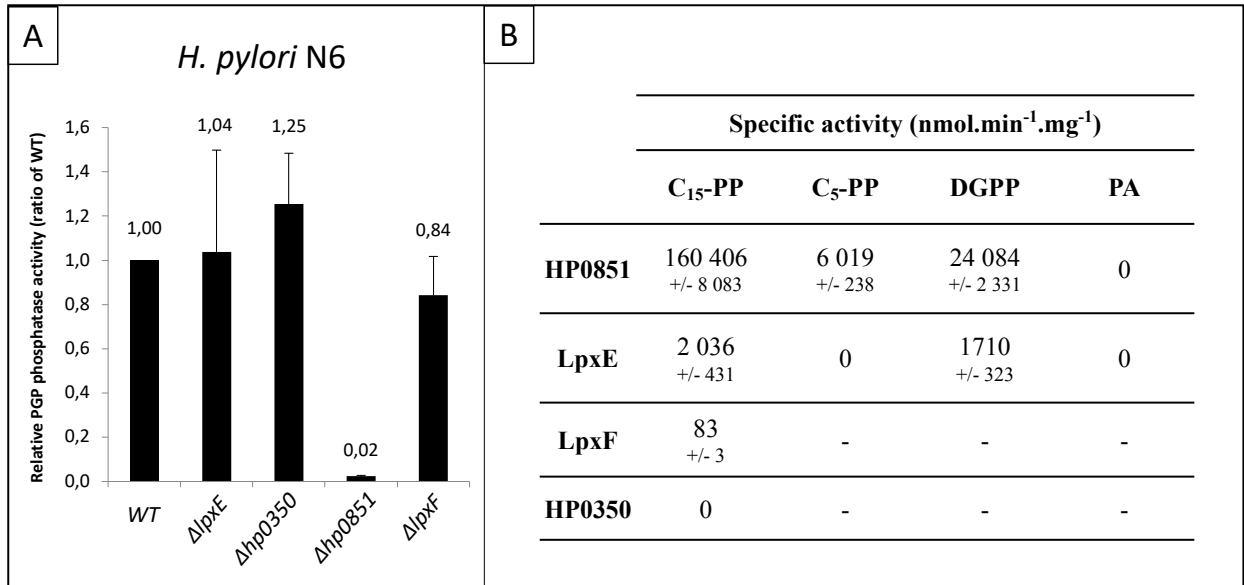


FIGURE 5



CHAPITRE II. RESULTATS NON PUBLIES

II. 1. LES PAP2 DE HELICOBACTER PYLORI

Les données présentées ci-dessous correspondent à l'étude globale des quatre UppP chez *H. pylori* qui ne sont pas incluent dans la publication précédente. Ces résultats ont pour but de mieux comprendre le rôle physiologique des PAP2 chez HP et leurs implications dans différents processus biologiques, en particulier pour HP0350. Aucun article scientifique n'a été publié sur cette enzyme et son rôle dans la déphosphorylation du C₅₅-PP reste encore inconnue à ce jour.

II. 1. A. IMPLICATION DANS LA CROISSANCE BACTERIENNE ET LA MORPHOLOGIE

L'étape de déphosphorylation du transporteur lipidique est une étape essentielle pour la viabilité cellulaire. Nous avons donc voulu observer l'impact de l'inactivation des gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* et *lpxF* dans la croissance bactérienne. Des courbes de croissance ont donc été réalisées chez la souche sauvage et chez les quatre simples mutants (**Figure 44**). Aucune variation de croissance n'a été observée pour les quatre simples mutants par rapport à la souche sauvage. L'inactivation d'une seule PAP2 n'a donc pas d'incidence sur la croissance bactérienne.

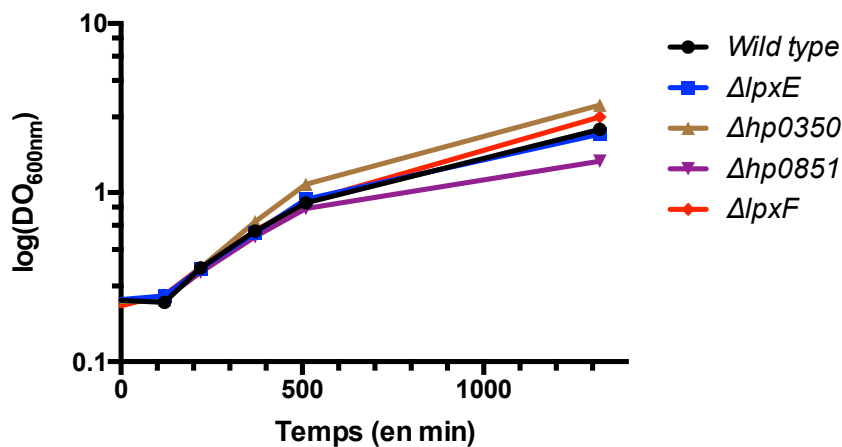


FIGURE 44: COURBES DE CROISSANCE DE HP N6.

LES COURBES DE CROISSANCE ONT ETE REALISEES EN MILIEU BHI LIQUIDE SUPPLEMENTEE AVEC 10% DE SERUM DE VEAU FETAL. LES CULTURES LIQUIDES ONT ETE INCUBEES A 37°C EN ATMOSPHERE DE MICROAEROPHILE. LES DENSITES OPTIQUE A 600NM ONT ETE MESUREE POUR LA SOUCHE SAUVAGE N6 (COURBE NOIRE), ET LES QUATRE SIMPLES MUTANTS *LpxE* (BLEUE), *HP0350* (MARRON), *HP0851* (VIOLET) ET *LpxF* (ROUGE) ET SONT REPRESENTES SUR UNE ECHELLE LOGARITHMIQUE EN FONCTION DU TEMPS (EN MINUTES).

De plus, les cinq souches ont été observées au microscope optique en contraste de phase à différents temps de culture, aucune variation phénotypique de HP n'a pu être constatée chez les quatre simples mutants par rapport à la souche sauvage (données non montrées). Les quatre PAP2 de HP n'ont donc pas de rôle dans la morphologie bactérienne.

II. 1. B. MESURE DE L'EXPRESSION DES PAP2 PAR PCR QUANTITATIVE APRES RETRO TRANSCRIPTION (q-RT-PCR)

Ensuite, nous avons exploré l'expression de ces PAP2, tout d'abord dans la souche sauvage de HP N6 puis lorsqu'un des gènes codant pour les PAP2 était invalidé. Pour cela, les ARN totaux des cinq souches ont été extraits en phase exponentielle de croissance puis rétro transcrit grâce à une transcriptase inverse et l'expression des gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* et *lpxF* a été quantifiée pour chaque souche par PCR quantitative (q-PCR). La quantification a été normalisée grâce à trois gènes endogènes (*gyrA*, *ppk* et l'*ARNr 16S*) dont l'expression au sein de chaque mutant et de la souche sauvage a été vérifiée et démontrée comme invariable parmi les différentes souches étudiées. Dans la **Figure 45**, la quantification correspond à la méthode du ΔCt . Le *cycle threshold* (Ct) correspond à la valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil. C'est-à-dire que plus celui-ci est élevé, moins l'expression est importante puisqu'il faut plus de cycle pour pouvoir détecter la fluorescence. Le ΔCt correspond à la différence entre le Ct de l'échantillon par rapport au contrôle endogène. Cette expérience a été réalisée en triplicat interne et biologique pour augmenter la puissance des analyses statistiques. Dans la souche *wild type* (**Figure 45**), aucune différence d'expression significative n'a été observée. Les gènes codant pour les quatre PAP2 chez HP sont exprimés de la même façon.

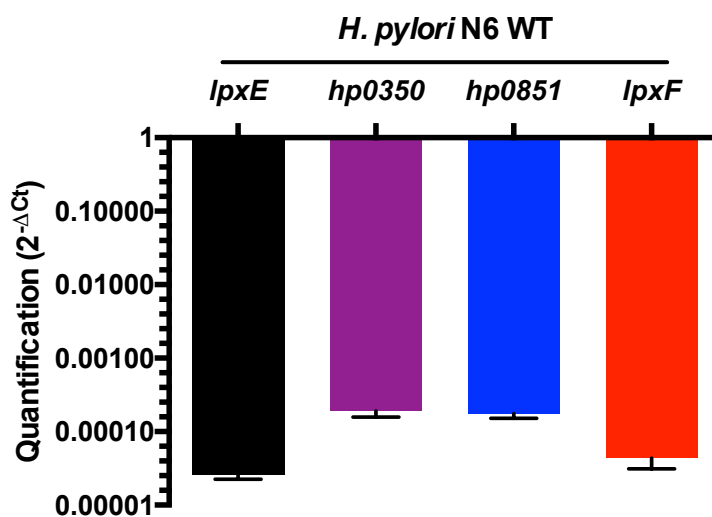


FIGURE 45: QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION PAR q-RT-PCR DES GENES CODANT POUR LES UPPP.

LPXE (HISTOGRAMME NOIR), *HP0350* (VIOLET), *HP0851* (BLEU) ET *LPXF* (ROUGE) CHEZ HP N6 DANS LA SOUCHE SAUVAGE.

Dans la **Figure 46**, la quantification correspond à la méthode du $\Delta\Delta Ct$. Pour cette analyse, on utilise un calibrateur qui correspond à l'échantillon auquel tous les autres sont comparés. Ici, le calibrateur correspond à la souche sauvage. Le $\Delta\Delta Ct$ correspond à la différence entre le ΔCt d'un simple mutant par rapport au ΔCt de la souche sauvage. Les résultats présentés dans cette figure sont exprimés en quantification relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) qui équivaut à un *fold change*. La souche sauvage est fixée à 1 et les mesures des simples mutants varient autour de cette valeur. Comme précédemment, cette expérience a été réalisée en triplicat interne et biologique. Aucune différence significative d'expression des gènes codant pour les PAP2 n'a pu être observée dans les quatre simples mutants. L'inactivation d'un des gènes codant pour une PAP2 n'a aucune influence significative sur l'expression des autres gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* ou *lpxF*.

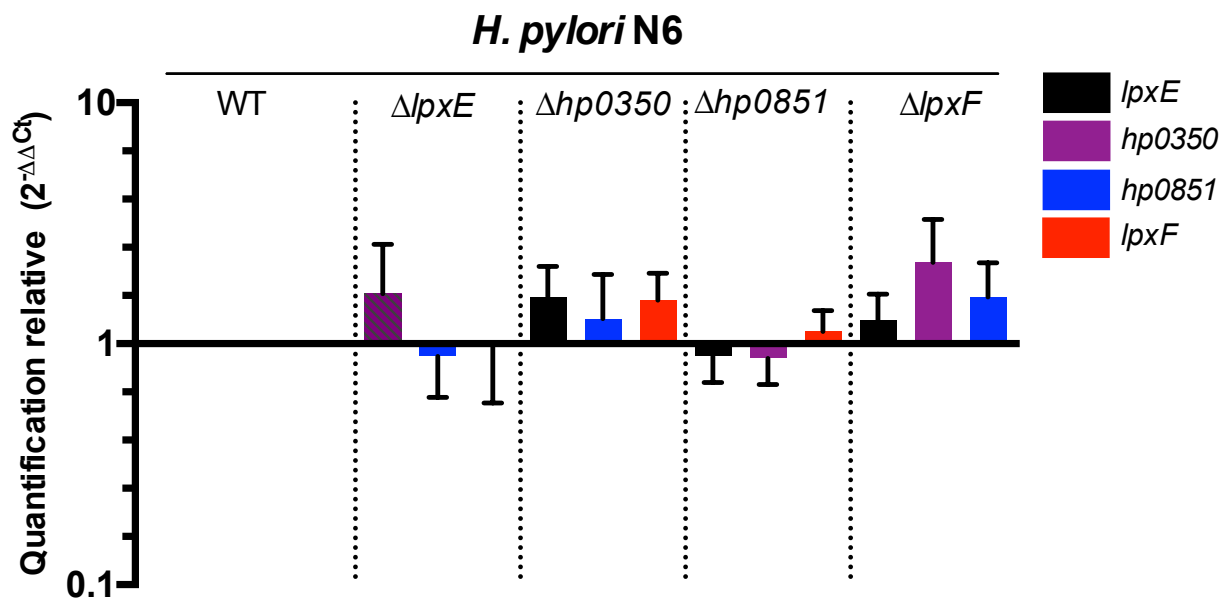


FIGURE 46: MESURE DE L'EXPRESSION PAR q-RT-PCR DES GENES CODANT POUR LES UppP.

LPXE (HISTOGRAMME NOIR), *HP0350* (VIOLET), *HP0851* (BLEU) ET *LPXF* (ROUGE) CHEZ HP N6 DANS LES QUATRE SIMPLES MUTANTS NORMALISES PAR TROIS GENES ENDOGENES ET PAR LA SOUCHE SAUVAGE.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la surexpression d'une des PAP2 de HP ou *E. coli* dans l'expression des UppP de HP. La quantification des données présentées en **Figure 47**, correspond également à la méthode du $\Delta\Delta C_t$ avec pour calibrateur, la souche HP N6 contenant les plasmides soit piLL2150 (faible expression chez HP), soit piLL2157 (forte expression chez HP) vides. Les histogrammes en **Figure 47. A et B** permettent d'observer les variations d'expression des quatre gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* et *lpxF*, lorsque LpxE, HP0350 et LpxF sont surexprimées. Lorsque ces trois PAP2 sont exprimées en très faible quantité dans la souche N6 *wild type*, aucune variation d'expression des quatre PAP2 n'est observable (**Figure 47. A**). Au contraire, lorsque celles-ci le sont fortement, on constate lors de la surexpression de LpxE et LpxF, une augmentation d'environ quatre fois de l'expression de *hp0350*. La surexpression de HP0350 n'a quant à elle pas d'impact sur l'expression de *lpxE*, *hp0851* et *lpxF* (**Figure 47. B**).

Les histogrammes en **Figure 47. C et D** permettent d'observer les variations d'expression des quatre gènes *lpxE*, *hp0350*, *hp0851* et *lpxF*, lorsque BacA, PgpB et YbjG sont surexprimées. Contrairement à la surexpression des PAP2 de HP, même une faible expression des UppP d'*E. coli* conduit à des variations de l'expression des gènes étudiés. En effet, on observe au sein des souches N6 + piLL2150*bacA*, N6 + piLL2150*pgpB* et N6 + piLL2150*ybjG*, une augmentation importante de l'expression de *hp0350* de 16, 12 et 6 fois, respectivement. Pour la souche N6 + piLL2150*bacA*, une augmentation de l'expression de *lpxF* de 3 fois et également constatée (**Figure 47. C**).

L'impact de la surexpression des UppP de *E. coli* sur le gène *hp0350* est d'autant plus important sur ces souches lorsque celles-ci sont fortement exprimées avec une augmentation de 9, 12 et 27 fois pour les souches N6 + piLL2150*bacA*, N6 + piLL2150*pgpB* et N6 + piLL2150*ybjG*, respectivement. L'expression de *hp0851* se trouve également augmentée pour les souches surexprimant BacA, PgpB et YbjG, d'environ 9, 2.7 et 5 fois, respectivement. Enfin, l'expression de *lpxF* est augmentée de 5 fois lors de la surexpression de YbjG (**Figure 47. D**).

En conclusion, l'expression du gène *hp0350*, selon des degrés différents, apparaît toujours augmentée lorsqu'une des PAP2 soit de HP ou une des UppP de *E. coli* est surexprimée.

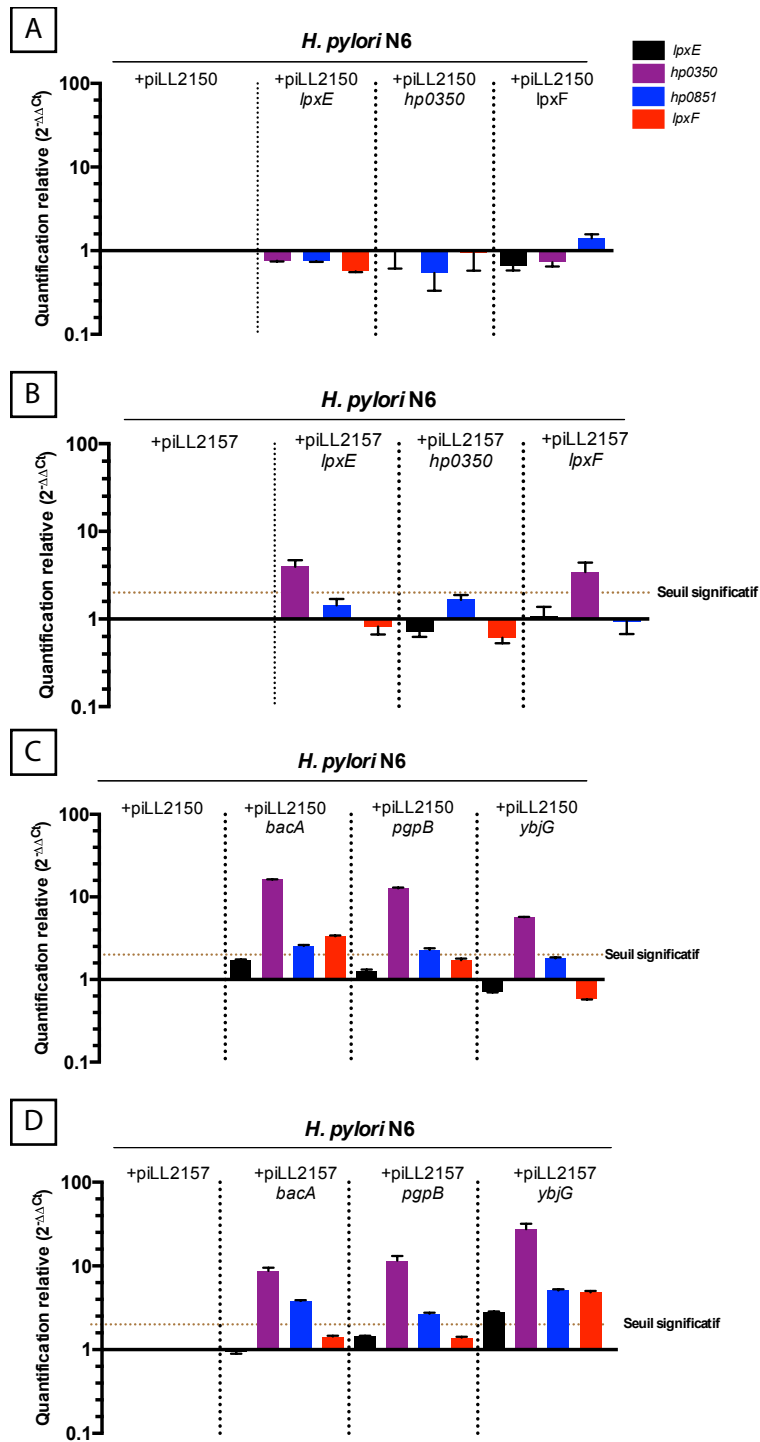


FIGURE 47: MESURE DE L'EXPRESSION PAR q-RT-PCR DES GENES CODANT POUR LES UppP.

lpxE (HISTOGRAMME NOIR), *hp0350* (VIOLET), *hp0851* (BLEU) ET *lpxF* (ROUGE) CHEZ HP N6 CONTENANT UN PLASMIDE piLL2150 (A ET C) OU piLL2157 (B ET D) EXPRIMANT UNE DES PAP2 DE HP (A ET B) OU UNE DES UppP DE *E. COLI* (C ET D).

II. 1. C. IMPACT DES PAP2 DANS LA PATHOGENESE DE HP

II. 1. C. a. COLONISATION DANS UN MODELE MURIN

L'étude des deux PAP2, LpxE et LpxF dans la colonisation de l'estomac précédemment réalisés au laboratoire et publié²⁹⁹ ont permis de montrer leur impact dans un modèle de colonisation chez la souris. La colonisation des deux simples mutants est fortement affectée et un double mutant *lpxE/lpxF* est incapable de coloniser l'estomac. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact des deux autres PAP2, HP0350 et HP0851 dans la colonisation. Les résultats concernant HP0851 ont déjà été décrits dans l'article en cours de soumission où HP0851 a été montré comme essentiel à la colonisation. Cette partie est donc dédiée aux résultats concernant HP0350. Deux types de colonisation ont été réalisées pour cette expérience. D'une part, la capacité du mutant *hp0350* seul à coloniser l'estomac a été étudié et d'autre part, une expérience de compétition entre la souche sauvage et le simple mutant a également été réalisée. Pour la colonisation, il est nécessaire d'utiliser une souche de HP capable de coloniser l'estomac murin, c'est pourquoi la mutation invalidant le gène *hp0350* a été transférée dans la souche de HP X47.

Pour la simple colonisation, $2 \cdot 10^8$ bactéries (X47 et X47 $\Delta hp0350$) ont été administrées par gavage à un panel de sept souris OF1 par souche pour pouvoir faire une analyse statistique significative. Pour l'expérience de compétition, un volume équimolaire, $1 \cdot 10^8$ bactéries de ces deux souches, ont été administrées également par gavage à un panel de sept souris OF1. Les trois panels de souris ont ensuite été sacrifiés à différents jours après infection (Jour 1, 4, 7, 15 et 29). Les estomacs de souris ont été prélevés et étalés sur milieux sélectifs ou non. Pour la compétition, les estomacs prélevés ont été étalés sur les deux types de milieux afin de distinguer la souche sauvage du mutant *hp0350*. Après cinq jours d'incubation à 37°C, le nombre de CFUs a été dénombré et rapporté au poids d'estomacs prélevés. Les résultats indiqués dans la **Figure 48** correspondent à deux expériences indépendantes réunies.

La capacité de colonisation du mutant *hp0350* est affectée significativement à partir de 15 jours. Le mutant est capable de coloniser l'estomac lors des premiers stades d'infection mais il perd progressivement sa capacité à persister dans l'estomac par rapport à la souche *wild type*, ce qui est

confirmé après un mois d'infection. Lors de la compétition, on remarque que le mutant *hp0350* perd progressivement sa capacité à coloniser l'estomac et cela dès les premiers stades de colonisation (jours 1 et 4) par rapport à la souche *wild type*. Après la phase d'infection précoce, on peut observer aux jours 15 et 29 que le mutant *hp0350* n'arrive plus à se maintenir dans l'estomac de façon significative en présence de la souche sauvage. L'expérience de colonisation d'estomac de souris a permis de mettre en évidence l'importance de HP0350 dans la pathogénèse de HP.

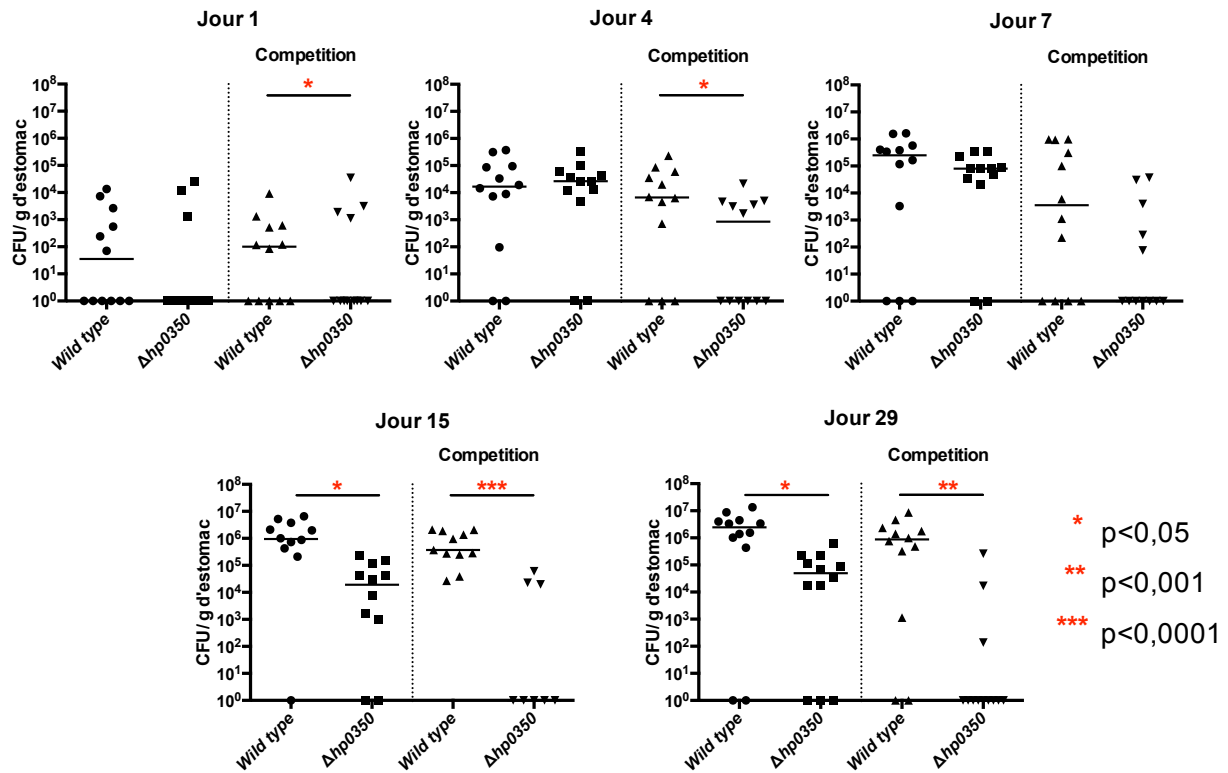


FIGURE 48: COLONISATION DE L'ESTOMAC DE SOURIS OF1 PAR LE MUTANT *hp0350* SEUL ET EN COMPÉTITION.

LE PANEL DE GAUCHE CORRESPOND AU MUTANT SEUL ET CELUI DE DROITE REPRÉSENTE L'EXPÉRIENCE DE COMPÉTITION.

Toutes les PAP2 de HP sont donc impliquées dans la pathogénèse impliquant différentes voies de biosynthèse. LpxE et LpxF le sont grâce à des modifications du lipide A et HP0851, l'est grâce à son activité phosphatase dépendante du C_{55} -PP et/ou du PGP.

Quel mécanisme d'action est à l'origine du défaut de colonisation observé pour le mutant *hp0350* ?

II. 1. C. b. STRUCTURE DU PGN

Plusieurs structures impliquées dans la pathogénèse ont été étudiées afin d'expliquer l'importance de HP0350 dans la colonisation. La première molécule étudiée est le PGN. En effet, de nombreuses études ont montré l'importance des mucopeptides libérés lors d'une infection bactérienne et la reconnaissance de ceux-ci par le système immunitaire de l'hôte (**Chapitre II. 2. C.**). De plus, comme l'activation lors du recyclage du transporteur lipidique, C₅₅-P, est impliqué directement dans la biosynthèse du PGN, nous avons étudié la composition en mucopeptides de celui-ci dans la souche sauvage et chez les quatre simples mutants pour détecter de potentielles variations. Pour cela, le PGN a été extrait et purifié des cinq souches en phase exponentielle de croissance. Puis, après une hydrolyse ménagée catalysée par la mutanolysine, les mucopeptides générés ont ensuite été séparés par HPLC et analysés par spectrométrie de masse. Les profils avec les mucopeptides correspondant sont représentés en **Figure 49**. Le profil de la souche sauvage correspond à un profil classique de digestion du PGN. Les noms des mucopeptides correspondant sont représentés dans le **Tableau 4**. Aucune différence n'a été constatée dans la composition en mucopeptides du PGN dans les simples mutants. Le *meso*-DAP a également été quantifié. Ceci permet d'établir s'il y a des variations, non pas dans la composition mais au niveau de la quantité de PGN dans un mutant. Les quatre simples mutants ne montrent pas de différence dans la quantité de PGN par rapport à la souche sauvage (données non montrées). Individuellement, les quatre PAP2 n'ont donc pas d'impact dans la composition et la quantité de PGN chez HP.

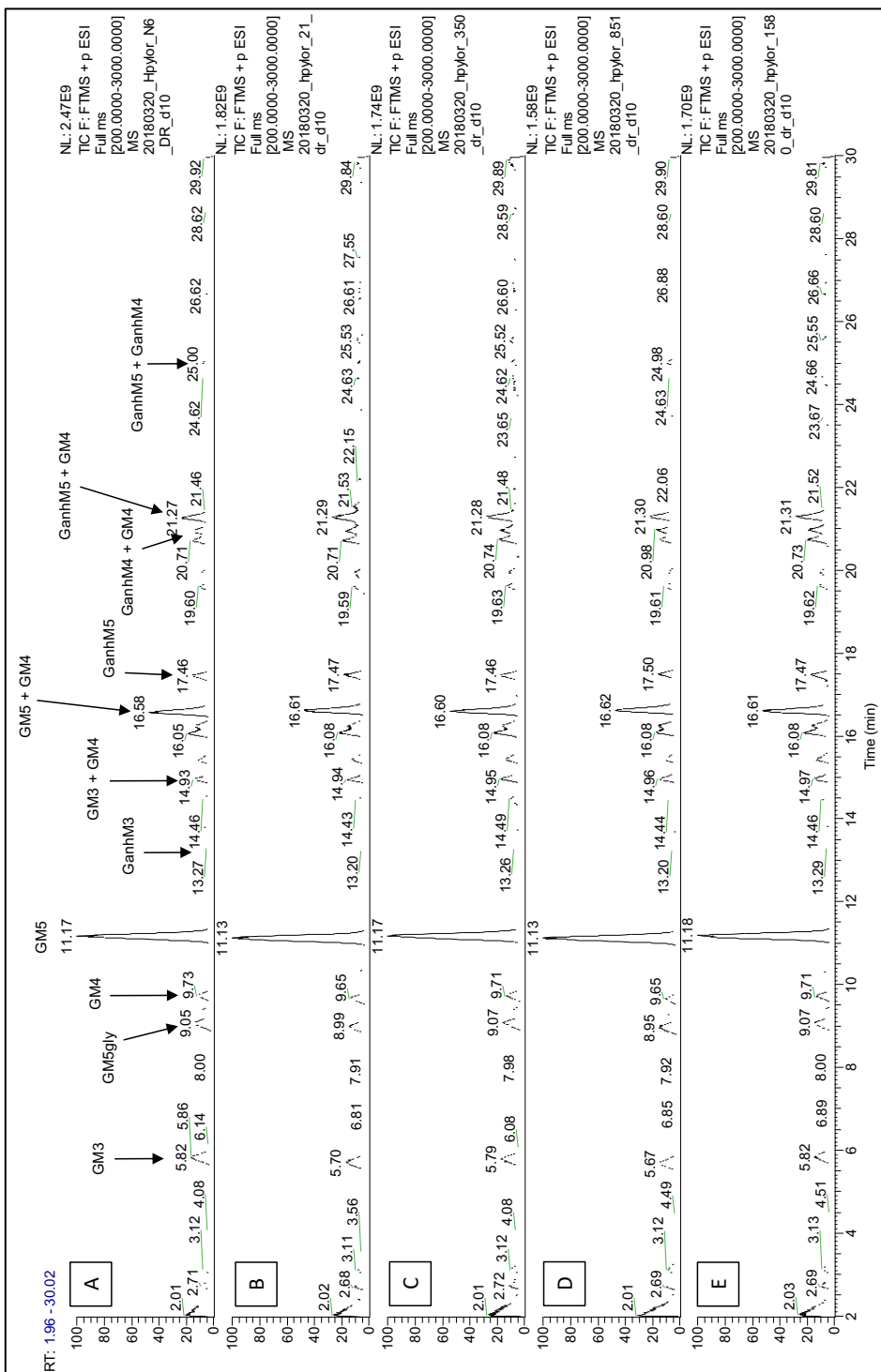


FIGURE 49: COMPOSITION EN MUROPEPTIDES DU PGN DES SOUCHES DE HP N6 SAUVAGE ET DES QUATRE SIMPLES MUTANTS.

A. WILD TYPE. B-E : SIMPLES MUTANTS B. *LPXE*, C. *HP0350*, D. *HP0851* ET E. *LPXF*.

Nom	Muropeptide	Formule
Disaccharide	GM	C19H34N2O13
Tri (E-mDap)	GM3	C34H58N6O20
Penta G (E-mDap; #5)	GM5 (gly position 5)	C39H66N8O22
Dipeptide (E)	GM2	C27H46N4O17
Tetra (E-mDap)	GM4	C37H63N7O21
Tetra (E-mDap)+AmDap_01	GM4 + AmDap	C47H80N10O25
Tetra (E-mDap)+AAmDap_01	GM4 + AAmDap	C50H85N11O26
Tetra (E-mDap)+AmDap_02	GM4 + AmDap	C47H80N10O25
Penta (E-mDap)	GM5	C40H68N8O22
Tetra (E-mDap)+ AAmDap_02	GM4 + AAmDap	C50H85N11O26
anhMurNAcTri (E-mDap)	GanhM3	C34H54N6O19
Tri-Tetra (E-mDap)	GM3+GM4	C71H119N13O40
Penta G - Tetra	GM5 gly + GM4	C76H127N15O42
Tetra-Tetra (E-mDap)	GM4+GM4	C74H124N14O41
Penta M (E-mDap;#5)	GM5 Met	C42H72N8O22S
anhMurNAcTetra (E-mDap)	GanhM4	C37H59N7O20
Penta-Tetra (E-mDap)	GM5+GM4	C77H129N15O42
anhMurNAcDipeptide (E)	GanhM2	C27H42N4O16
anhMurNAcPenta (E-mDap)	GanhM5	C40H64N8O21
anhMTetra-Tri (E-mDap)	GanhM4+ GM3	C71H115N13O39
anhMTetra-Penta G (E-mDap; #5)	GanhM4+ GM5 gly	C76H123N15O41
anhMTetra-Tetra (E-mDap)	GanhM4+ GM4	C74H120N14O40
anhMTetra-Penta (E-mDap)	GanhM4+ GM5	C77H125N15O41
anhMPenta-Tetra (E-mDap)	GanhM5+ GM4	C77H125N15O41
anhMTri-anhMTetra (E-mDap)	GanhM3+ GanhM4	C71H111N13O38
anhMTetra-anhMTetra (E-mDap)	GanhM4+ GanhM4	C74H116N14O39
anhMTetra-anhMPenta (E-mDap)	GanhM4+ GanhM5	C77H121N15O40

TABLEAU 4: CORRESPONDANCE DES NOMS ET FORMULES DES MUROPEPTIDES RETROUVES EN FIGURE 49.

II. 1. C. c. STRUCTURE DU LPS

LpxE et LpxF modifient la partie lipidique du LPS, le lipide A par déphosphorylation des phosphates en position 1 et 4'. Nous avons donc voulu observer si HP0350 et HP0851 avaient également un rôle dans cette structure. Comme décrit dans le **Chapitre II. 2. B. b.** le LPS de HP est peu immunogène par rapport à d'autres bactéries lui permettant de persister dans l'estomac durant une longue période sans être détecté par le système immunitaire de l'hôte. La description des enzymes impliquées dans les modifications du LPS lui permettant d'être peu immunogène est donc essentielle et peut permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques pour éradiquer HP. Deux parties du LPS ont été étudiées : Lipidique, le lipide A et saccharidique, l'antigène O.

II. 1. C. c. 1. STRUCTURE DU LIPIDE A

Le lipide A a été extrait et purifié des cinq souches (*wild type* et les quatre simples mutants) en phase exponentielle de croissance. L'abondance relative des espèces de lipide A a été décrite et les structures correspondantes identifiées par spectrométrie de masse (Travail en collaboration avec l'équipe de S. Trent, Géorgie, États-Unis). Dans la **Figure 50**, sont représentés les spectres d'abondance relative (%) avec la structure du lipide A correspondant au pic majoritaire. Le lipide A de la souche *wild type* est une forme tétra-acylé, déphosphorylé en position 4' par LpxF et un groupement PE en position 1 après la déphosphorylation de LpxE. Dans le mutant *lpxE*, le groupement phosphate n'a pas été enlevé en position 1 et l'ajout classique du groupement PE est donc impossible laissant apparaître une forme de lipide A tétra-acylée, mono-phosphorylée en position 1. La structure du lipide A dans le mutant *lpxF*, quant à elle, possède bien le groupement PE en position 1 mais le groupement phosphate en position 4 est toujours présent. Ces données confirment les résultats de la structure du lipide A déjà publiées pour les mutants *lpxE* et *lpxF* mais au sein d'une autre souche de HP, la souche N6 au lieu de J99.

Aucune différence de structure du lipide A n'a pu être identifiée pour les mutants *hp0851* et *hp0350* qui possède exactement la même structure que la souche sauvage. HP0851 et HP0350 n'ont donc aucune action dans la structure lipidique du LPS.

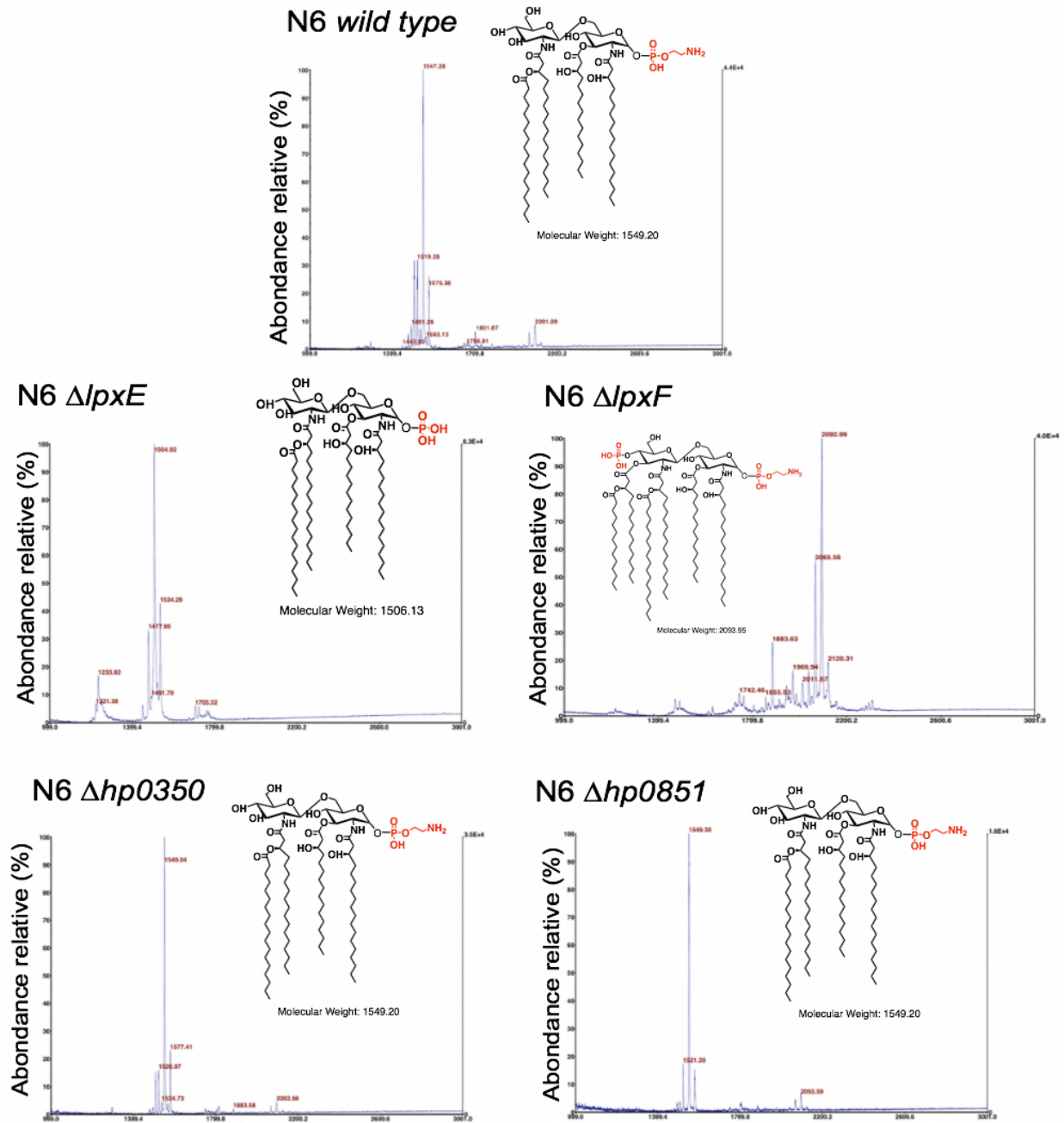
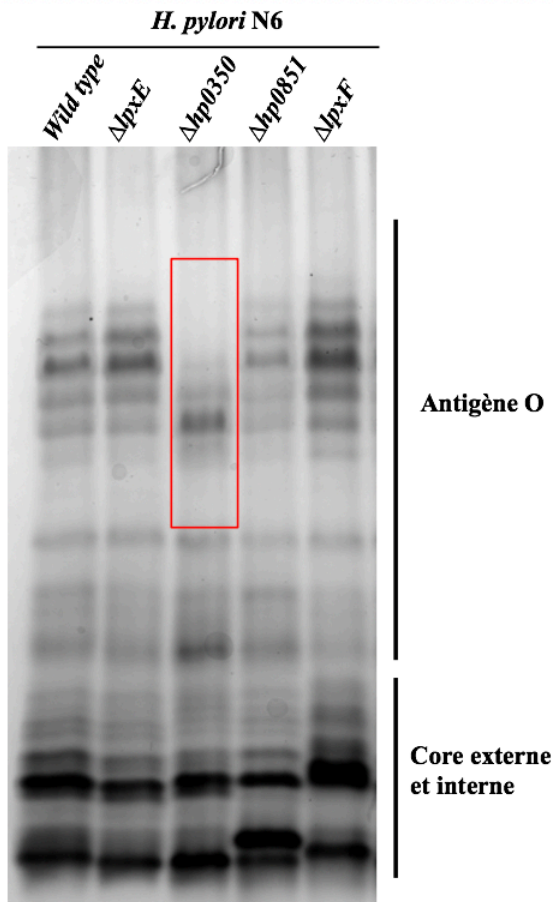


FIGURE 50: STRUCTURE DU LIPIDE A DE HP N6 ET DES 4 SIMPLS MUTANTS.

II. 1. C. c. 2. L'ANTIGENE O

Le LPS a été extrait des cinq souches (*wild type* et les quatre simples mutants) en phase exponentielle de croissance. Les échantillons ont été traités par de la protéinase K afin d'éliminer toute trace de protéines et déposés sur un grand gel d'acrylamide 12% (Stain free™). Cette technologie développée par l'entreprise BioRad permet de visualiser après exposition aux ultraviolets, les tryptophanes des protéines et s'assurer ici que le traitement à la protéinase K a bien dégradé toutes les protéines présentes dans les échantillons. La visualisation des sucres se fait ensuite grâce à une coloration au nitrate d'argent.



La **Figure 51** met en évidence particulièrement le niveau de polymérisation de l'antigène O des cinq souches étudiées. On peut constater que les antigènes O des mutants *lpxE*, *hp0851* et *lpxF* ont exactement le même niveau de polymérisation que la souche *wild type*. *LpxE*, *LpxF* et *HP0851* n'ont donc pas d'impact dans la structure de l'antigène O de HP N6. Cependant, dans le mutant *HP0350*, on peut observer une modification dans la structure de l'antigène O par rapport à la souche *wild type* (encadré rouge) avec un niveau de polymérisation nettement plus faible. Un deuxième phénotype lié à la pathogénèse a donc été identifié pour *HP0350* qui se trouve impliqué dans le niveau de polymérisation de l'antigène O.

FIGURE 51: VISUALISATION DE L'ANTIGENE O APRES COLORATION AU NITRATE D'ARGENT

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le C₅₅-P est un lipide clé du métabolisme de HP comme dans la plupart des autres bactéries. Il est impliqué dans la synthèse de nombreux composants de la paroi bactérienne tels que l'antigène O, les acides téichoïques ou encore la biosynthèse du PGN³⁰⁸. La biosynthèse du C₅₅-PP a fait l'objet de nombreuses études ces 20 dernières années et la résolution de la structure de l'enzyme UppS a permis un haut degré de compréhension des mécanismes mis en jeu. *A contrario*, l'étape d'activation de ce transporteur par déphosphorylation du C₅₅-PP en C₅₅-P est peu connue et particulièrement chez HP. Ces étapes se situent à deux niveaux, (i) du côté cytoplasmique immédiatement après la synthèse du C₅₅-PP et (ii) du côté périplasmique de la membrane interne lors de la libération du transporteur sous forme inactive après le transfert des unités glycanes dans le PGN préexistant. Deux familles de protéines membranaires ont été décrites montrant une activité phosphatase dépendante du C₅₅-PP : la famille BacA, d'une part et la superfamille des PAP2, d'autre part. Par homologie de séquence, quatre enzymes appartenant à la famille de PAP2 ont été identifiées chez HP (LpxE, HP0350, HP0851 et LpxF). Deux d'entre elles ont déjà été caractérisées au laboratoire (LpxE et LpxF) catalysant la déphosphorylation du lipide A²⁹⁹. Les deux autres, HP0350 et HP0851 restent encore aujourd'hui non caractérisées.

Nous avons montré au cours de cette étude que les PAP2 de HP (LpxE, HP0350, HP0851 et LpxF) n'ont pas d'impact sur la croissance ou la morphologie bactérienne et elles possèdent le même niveau d'expression même lorsque le gène, de l'une d'entre elles, a été invalidé. Cependant, nous avons pu constater que ces enzymes étaient impliquées dans des processus particuliers spécifiques à chacune, ayant un effet dans la pathogénèse de HP.

HP0350 et HP0851, qui n'ont pas encore été étudiées à ce jour, sont des protéines orthologues à PgpB d'*E. coli* qui a été décrit comme possédant une double fonction avec une activité UppP d'une part mais également impliquée dans la biosynthèse des phospholipides par déphosphorylation du PGP d'autre part⁹⁷.

Les données en cours de publication ont permis de caractériser particulièrement HP0851. Ces travaux de recherche ont pu mettre en évidence pour la première fois que la PAP2, HP0851, est la principale UppP de HP catalysant la déphosphorylation du C₅₅-PP en C₅₅-P. Nous avons décrit que HP0851 est responsable de 90% de cette activité avec un pH optimal de 5, qui est le pH auquel HP doit faire face dans le mucus gastrique de l'Homme. Par une expérience de complémentation, HP0851 est fonctionnelle chez *E. coli* en complétant l'activité UppP dans un triple mutant *uppP* conditionnel. De plus, nous avons démontré le rôle central de HP0851 *in vivo*. En effet, par un mécanisme encore non élucidé, HP0851 apparaît important pour la résistance aux CAMPs (diminution de sensibilité de quatre fois pour le mutant *hp0851*). Lors de ces travaux, nous avons pu exclure un changement du niveau de phosphorylation du lipide A pour expliquer ce phénotype, les résultats de spectrométrie de masse ne montrant aucune différence dans le mutant *hp0851* par rapport à la souche sauvage.

Cette étude a pu mettre en exergue la double fonction de HP0851. Nous avons décrit un autre substrat spécifique pour HP0851 corrélé à la biosynthèse des phospholipides.

HP0851 agit comme PgpB d'*E. coli* catalysant 98% de la conversion du PGP en PG. Chez HP, par homologie de séquence, seulement une Pgp a été identifiée, PgpA (HP0737). Une analyse globale du génome de HP par insertion d'un transposon a décrit *pgpA* comme un gène essentiel⁹³ mais nous avons confirmé par remplacement du gène *pgpA* par une cassette de résistance que celui-ci n'est pas essentiel (données non montrées). Cette enzyme pourrait représenter les 2% restant de l'activité Pgp chez HP. Chez *E. coli*, les trois enzymes Pgp ont déjà été décrites, PgpA, PgpB et PgpC et seulement un triple mutant est létal⁹⁷. Même si la composition en phospholipides diffère entre *E. coli* et HP avec 25% et 12,5% de PG, respectivement^{71,82}, un double mutant *pgpA/hp0851* pourrait être létal pour HP. Ceci est d'autant plus vrai que l'activité PGPase de la famille PgpA est dépendante du Mg²⁺ et que les conditions enzymatiques pour les PAP2 sont incompatibles avec la présence de Mg²⁺. Ainsi, il se peut que PgpA puisse contribuer significativement à la génération de PG contrairement à ce que suggèrent les résultats avec les extraits de membrane du mutant *hp0851*.

HP a la particularité d'exister sous deux formes, hélicoïdale et cocoïde. Le rôle physiologique des formes cocoïdes de HP est sujet à controverse depuis de nombreuses années. Il a été suggéré qu'il pourrait s'agir de formes de persistance de HP. Le PG est important pour la formation des cocoïdes. Pendant cette transition, il y a une diminution du PG corrélé à une augmentation de la CL⁸³. La CL provient de la condensation de deux molécules de PG catalysé par la potentielle CL synthase (HP0190). La CL est importante pour augmenter la courbure de membrane qui s'opère durant la transition en forme cocoïde. Si la synthèse du PG est réduite dans un mutant *hp0851*, nous pouvons poser l'hypothèse que cette conversion en cocoïde pourrait être altérée et par conséquent affecter la persistance de *H. pylori* dans sa niche. L'implication de HP0851 dans la biosynthèse des phospholipides pourrait aussi expliquer la diminution de la résistance à la polymyxine B observée. Les CAMPs forment des pores dans la membrane cytoplasmique conduisant à une fuite de composés cytoplasmiques. Si la composition en phospholipides est altérée dans un mutant *hp0851*, particulièrement avec une accumulation de PGP, la charge négative de la membrane pourrait être augmentée favorisant la formation de pore par les CAMPs. L'analyse de la composition en phospholipides de la membrane permettra de tester cette hypothèse. Malgré le rôle central de HP0851, la délétion du gène *hp0851* n'est pas létale pour HP *in vitro*, impliquant l'existence d'une ou plusieurs autres UppP impliquées dans cette activité.

LpxE qui a été décrite comme une 1 phosphatase du lipide A et confirmé dans cette étude dans une autre souche (N6 au lieu de J99) est importante pour la colonisation de l'estomac et la reconnaissance par les CAMPs. En effet, les résultats de sensibilité à la polymyxine B ont confirmé les résultats déjà publiés mais dans la souche de HP N6, avec une augmentation de la sensibilité de 32 fois par rapport à la souche sauvage. Ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence la double fonction de LpxE. En effet, en plus de son activité 1 phosphatase du lipide A, nous avons montré qu'elle possédait un autre substrat spécifique *in vitro*, le C₅₅-PP, avec un pic maximal d'activité à 900 nmol/min/mg pour un pH de 7,4. Les données d'activité UppP dans les membranes de HP ne permettent pas de conclure quant aux proportions d'activité spécifique de LpxE à cause

d'un écart type trop important. L'invalidation de son gène avec celui codant pour HP0851 est létale pour HP et seul HP0851 et LpxE sont capables de compléter ce phénotype. Au regard des données *in vitro* et des expériences de complémentation, nous pouvons affirmer que cette PAP2 joue bien un rôle d'UppP. L'implication de LpxE dans d'autres composés de la paroi bactérienne a été étudié tels que la structure du PGN ou celle de l'antigène O. Nous pouvons confirmer que LpxE n'est pas impliquée dans la composition de ces deux structures mais que cette PAP2 correspond bien à 1 phosphatase du lipide A et à une UppP chez HP. Finalement, LpxE pourrait exhiber aussi une faible activité PGPase. La protéine recombinante a montré une activité significative envers le PGP. Comme discuté ci-dessus, les conditions des essais PAP2 sont incompatibles avec les essais enzymatiques pour la famille PgpA. Ainsi, on peut suggérer que l'activité PGPase de 2% trouvée dans les membranes du mutant *hp0851* puissent provenir de l'activité PGPase de LpxE.

HP0851 est essentielle pour la colonisation de l'estomac. L'hypothèse expliquant ce phénotype est basé sur le pH optimal de LpxE. En effet, nous avons montré que LpxE était la seule PAP2 capable de compléter l'activité UppP en absence de HP0851 mais son pH optimal est de 7,4. Au cours des expériences de colonisation, LpxE est incapable de fonctionner correctement parce que cette enzyme n'est pas fonctionnelle à pH 5 (diminution de 42 fois de l'activité UppP) et donc probablement incapable de compléter HP0851. En effet, en dépit du fait que LpxE possède une double fonction UppP et 1 phosphatase du lipide A, la première étape de la colonisation de l'estomac par HP implique une survie de la bactérie à des pH faibles entre 2 dans le lumen à 5-6 dans le mucus. Ces premières étapes sont cruciales pour l'efficacité de la colonisation de l'estomac par HP et est dépendante également de sa mobilité et de son enzyme uréase¹⁰. Ce n'est qu'une fois que HP a atteint le mucus et tamponne le pH de son environnement que LpxE pourrait retrouver une activité UppP. Ainsi, on ne peut pas exclure un rôle physiologique *in vivo* de LpxE dans la déphosphorylation du C₅₅-PP en C₅₅-P après les premières étapes de colonisation une fois que HP a atteint sa niche, la couche de mucus et la surface épithéliale. Mais pour tester cette hypothèse, il faudrait faire des expériences de colonisation avec le mutant *hp0851* en présence d'inhibiteurs des pompes à proton (comme l'oméprazole) qui permettraient de relever le pH du lumen de l'estomac.

Néanmoins, les travaux précédents du laboratoire sur LpxE ont montré que celle-ci est requise pour une colonisation à long terme. Cependant, ceci est principalement dû à son rôle de 1 phosphatase du lipide A et à l'échappement au système immunitaire innée via les récepteur TLR4 plutôt qu'à son activité UppP puisque le mutant *lpxE* est capable de coloniser des souris invalidées pour le gène TLR4²⁹⁹. Ainsi, nous pouvons conclure que globalement, HP0851 et LpxE sont centrales pour la survie de HP tout au long de la colonisation de HP de l'estomac et constituent de bonnes cibles thérapeutiques.

Nous avons également confirmé l'action de LpxF décrite comme la 4'phosphatase du lipide A de HP dans la souche N6 au lieu de J99. Cette enzyme est encore plus importante pour la colonisation de l'estomac que LpxE et la résistance aux CAMPs. Les résultats de sensibilité à la polymyxine B ont confirmé la grande sensibilité d'un mutant *lpxF* par rapport à la souche sauvage. Dans la souche N6, le mutant *lpxF* est 128 fois plus sensible que la souche *wild type*. De plus, LpxF est incapable de compléter l'activité UppP dans un double mutant *lpxE/hp0851* chez HP mais également incapable de compléter l'activité dans le triple mutant thermosensible *bacA/pgpB/ybjG* chez *E. coli*. De plus, LpxF n'a pas d'incidence sur le niveau de polymérisation de l'antigène O. Aucun autre phénotype étudié impliquant des modifications autres que celle du lipide A n'ont pu être observées pour cette enzyme PAP2, laissant supposer sa spécificité pour le lipide A et non un rôle dans le recyclage du C₅₅-PP ou la synthèse du PG.

Chez HP, les quatre PAP2 (LpxE, HP0350, HP0851 et LpxE) ont été identifiées par homologie de séquence avec le PAP2 d'*E. coli* déjà décrite (PgpB, LpxT et YbjG). Parmi les bactéries, les homologues des PAP2 sont souvent limités à la seule séquence signature de cette famille avec trois motifs distincts C1, C2 et C3. Les enzymes de la superfamille des PAP2 sont des histidines phosphatases et possèdent une triade de résidus catalytiques His_{C2}-Asp_{C3}-His_{C3} conservée chez *E. coli*.

Nous avons montré que HP0350 ne possédait aucune activité phosphatase spécifique *in vitro* avec pour substrat le C₅₅-PP. Cette absence d'activité phosphatase pourrait s'expliquer par le fait que HP0350 ne possède aucun des résidus qui compose la triade catalytique (His_{C2}-Asp_{C3}-His_{C3}). La fonction de HP0350 dans l'activation du transporteur reste donc à élucider. Cette protéine n'a pas d'impact dans la composition du PGN. Elle n'a pas non plus de rôle dans la structure du lipide A, ce qui explique aussi l'absence de différence de sensibilité à la polymyxine B chez le mutant *hp0350* par rapport à la souche sauvage. D'ailleurs, l'absence d'effet sur la CMI à la polymyxine B contrairement au mutant *hp0851* est également concordant avec l'absence d'activité phosphatase sur les autres substrats testés en particulier le PGP. Cependant, grâce aux expériences de colonisation chez la souris, nous avons pu montrer son implication dans la pathogénèse de HP. Lorsque celle-ci est absente, la capacité de HP à coloniser l'estomac est fortement affectée et en présence de la souche sauvage (expérience de compétition), le mutant devient alors incapable de se maintenir dans l'estomac. Nous avons également montré que HP0350, par un mécanisme encore non élucidé à ce jour, intervient dans la polymérisation de l'antigène O. En son absence, on observe un antigène O plus court par rapport à la souche sauvage. Ceci pourrait influencer sur la virulence de HP et être à l'origine du phénotype de colonisation observé.

Il est important de noter que les étapes de polymérisation de l'Antigène O s'effectuent dans le cytoplasme et que les motifs PAP2 de HP0350 ont été prédits du côté périplasmique de la membrane. Il ne pourrait donc pas être possible à HP0350 d'interagir directement sur cette synthèse. Cependant, les expériences de q-RT PCR lors de la surexpression d'une phosphatase de HP ou *E. coli* a permis de montrer que l'expression de *hp0350* été augmentée à chaque fois de manière significative. HP0350 est donc étroitement lié à l'expression des autres PAP2 et pourrait jouer un rôle de régulateur chez HP. En fixant le C₅₅-P, HP0350 pourrait distribuer le C₅₅-P vers des polymérases partenaires comme WecA, première étape de synthèse de l'Antigène-O et ainsi garantir un flux constant de C₅₅-P qui sinon serait utilisé préférentiellement pour des processus essentiels pour la survie de la bactérie, notamment comme la synthèse du PGN. Il est également

possible d'imaginer qu'un autre acteur, en concert avec HP0350 puisse être à l'origine du niveau de polymérisation observé dans le mutant *hp0350*.

Même si ces PAP2 de HP ne semble pas avoir d'impact sur la composition du PGN, il serait intéressant de suivre la biosynthèse de celui-ci dans la souche sauvage et les quatre mutants des PAP2 par un radio marquage spécifique du *meso*-DAP. Pour cela, il sera nécessaire d'inactiver le gène *lysA* pour toutes les souches, qui catalyse la conversion du *meso*-DAP en Lys, par remplacement du gène par une cassette de résistance.

Pour compléter l'analyse de la sensibilité du mutant *hp0851* et la capacité des CAMPs à se lier à la surface, nous pourrions visualiser cette liaison par fluorescence dans ce mutant et la souche complémentée. Pour cela, nous pourrions utiliser de la polymyxine B fluorescente et après une incubation des bactéries avec celle-ci, visualiser cette interaction par microscopie fluorescente. D'autres molécules mimant le peptide antimicrobien pourraient également être testées tels que l' α ou la β -défensine humaine afin de compléter cette étude.

Pour confirmer que le défaut de colonisation observé pour le mutant *hp0350* est bien dû à son niveau de polymérisation de l'antigène O, il serait intéressant d'utiliser un modèle cellulaire *in vitro* pour mesurer la réponse aux récepteurs *hTLR4*-MD2 ou *mTLR4*-MD2. Après purification du LPS de la souche sauvage, du mutant *hp0350*, et de la souche complémentée, celui-ci serait utilisé pour stimuler des cellules HEK-293 contenant des plasmides exprimant le récepteur *hTLR4*-MD2 ou *mTLR4*-MD2. Ce système mesurant l'activation d'un récepteur de l'immunité innée par luminescence est déjà mis en place au laboratoire.

Pour se rapprocher au plus d'un système *in vivo*, il serait également intéressant de mesurer la capacité des mutants *hp0851*, *hp0350* et les souches complémentées respectives, à infecter des cellules épithéliales gastriques de type AGS ou MKN45.

Pour rechercher les protéines interagissant avec HP0350, nous pourrions mesurer (i) l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène O tels que *wecA*, *wzk* ou encore *waal* par q-RT PCR et (ii) réaliser des expériences de co-immunoprécipitation avec la protéine HP0350.

L'activité phosphotransférase de LpxT chez *E. coli* soulève la question de cette même activité chez les PAP2 de HP. Une recherche dans la littérature des molécules de l'enveloppe qui sont connues pour être phosphorylées au cours de leur biosynthèse pourra être réalisée. Si des molécules étaient identifiées, et si des précurseurs non-phosphorylés peuvent être obtenus, ce dernier pourrait être testé comme molécule accepteur.

De façon alternative, les bactéries des différents mutants et de la souche sauvage pourraient être marquées au ^{32}P i. Après extraction, nous pourrions analyser le lipidome et le phosphoprotéome par des techniques de chromatographie sur couche mince et d'électrophorèse, respectivement. La différence entre les profils obtenus des différentes souches conduira à la détection de molécules dont le niveau de phosphorylation a été modifié au sein des mutants par rapport à la souche sauvage. L'identification de ces molécules pourra être réalisée par spectrométrie de masse.

Enfin, nous avons au laboratoire la protéine recombinante HP0350. Pour vérifier notre hypothèse sur la capacité de HP0350 à réguler l'utilisation du $\text{C}_{55}\text{-P}$, nous pouvons tester son implication dans la formation du lipide I et de l'antigène O *in vitro*. En effet, si nous utilisons du $\text{C}_{55}\text{-P}$ avec l'enzyme MraY et de l'UDP-MurNAc pentapeptide en présence de HP0350, cette dernière devrait inhiber la synthèse du lipide I. *A contrario*, si la même expérience est réalisée en présence de l'enzyme WecA, d'UDP-GlcNAc, HP0350 ne devrait pas influencer l'action de WecA ou au contraire l'activer.

Ces travaux de recherche ont permis une meilleure compréhension du rôle physiologique des PAP2 de HP et de leur implication ou non dans des voies de biosynthèse autres que la déphosphorylation du $\text{C}_{55}\text{-PP}$ ainsi que dans la pathogénicité. Parmi les quatre PAP2 de HP, nous avons identifiés pour la première fois, HP0851, la principale UppP et Pgp de HP. Cette étude a également permis d'identifier la seconde UppP de HP, LpxE. Le rôle de HP0350 reste encore à explorer mais cette étude a permis d'établir des axes de recherche pour l'étude de cette protéine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lugli, A. *et al.* Napoleon Bonaparte's gastric cancer: a clinicopathologic approach to staging, pathogenesis and etiology. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 52–57 (2007).
2. Profesorowi, Jw. P. Drowi Edwardowi Sas Korczyńskiemu. 531
3. Kidd, M. & Modlin, I. M. A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion* **59**, 1–15 (1998).
4. Marshall, B. & Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* **323**, 1311–1315 (1984).
5. Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B. & Glancy, R. J. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* **142**, 436–439 (1985).
6. Morris, A. & Nicholson, G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* **82**, 192–199 (1987).
7. Goodwin, C. S. *et al.* Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 938–943 (1989).
8. Goodwin, C. S. *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 397–405 (1989).
9. Goodwin, C. S. & Armstrong, J. A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **9**, 1–13 (1990).
10. Smoot, D. T., Mobley, H. L., Chippendale, G. R., Lewison, J. F. & Resau, J. H. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **58**, 1992–1994 (1990).
11. Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R. & Krakowka, S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**, 2470–2475 (1991).
12. O'Toole, P. W., Lane, M. C. & Porwollik, S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* **2**, 1207–1214 (2000).
13. Yoshiyama, H., Nakamura, H., Kimoto, M., Okita, K. & Nakazawa, T. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J. Gastroenterol.* **34 Suppl 11**, 18–23 (1999).
14. Van de Bovenkamp, J. H. B. *et al.* The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for

Helicobacter pylori in the human stomach. *Helicobacter* **8**, 521–532 (2003).

15. Appelmelk, B. J. *et al.* Phase Variation in *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **66**, 70–76 (1998).
16. Roesler, B. M., Rabelo-Gonçalves, E. M. A. & Zeitune, J. M. R. Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin. Med. Insights Gastroenterol.* **7**, 9–17 (2014).
17. Amieva, M. R. *et al.* Disruption of the Epithelial Apical-Junctional Complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**, 1430–1434 (2003).
18. Viala, J. *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**, 1166–1174 (2004).
19. Junaid, M. *et al.* Vacuolating cytotoxin A (VacA) – A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*. *Toxicon* **118**, 27–35 (2016).
20. Pesci, E. C. & Pickett, C. L. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene* **143**, 111–116 (1994).
21. Hazell, S. L., Evans, D. J. & Graham, D. Y. *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 57–61 (1991).
22. Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M. & Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449–490 (2006).
23. Baker, L. M. S., Raudonikiene, A., Hoffman, P. S. & Poole, L. B. Essential Thioredoxin-Dependent Peroxiredoxin System from *Helicobacter pylori*: Genetic and Kinetic Characterization. *J. Bacteriol.* **183**, 1961–1973 (2001).
24. Bury-Moné, S. *et al.* Presence of Active Aliphatic Amidases in *Helicobacter* Species Able To Colonize the Stomach. *Infect. Immun.* **71**, 5613–5622 (2003).
25. Gobert, A. P. *et al.* *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13844–13849 (2001).
26. Cover, T. L. & Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* **136**, 1863–1873 (2009).
27. Ahmed, K. S. *et al.* Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. *Singapore Med. J.* **47**, 291–296

(2006).

28. Momtaz, H., Souod, N., Dabiri, H. & Sarshar, M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J. Gastroenterol. WJG* **18**, 2105–2111 (2012).
29. Al Sayed, A. *et al.* Oral Cavity as an Extragastric Reservoir of *Helicobacter pylori*. *ISRN Gastroenterol.* **2014**, (2014).
30. Ismail, H., Morgan, C., Griffiths, P., Williams, J. & Jenkins, G. A Newly Developed Nested Pcr Assay for the Detection of *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity. *J. Clin. Gastroenterol.* **50**, 17–22 (2016).
31. Amiri, N., Abiri, R., Eyvazi, M., Zolfaghari, M. R. & Alvandi, A. The frequency of *Helicobacter pylori* in dental plaque is possibly underestimated. *Arch. Oral Biol.* **60**, 782–788 (2015).
32. Liu, Y. *et al.* An Epidemiologic Study on the Correlation Between Oral *Helicobacter pylori* and Gastric *H. pylori*. *Curr. Microbiol.* **58**, 449 (2009).
33. Atapoor, S., Safarpour Dehkordi, F. & Rahimi, E. Detection of *Helicobacter pylori* in Various Types of Vegetables and Salads. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**, (2014).
34. Bellack, N. R., Koehoorn, M. W., MacNAB, Y. C. & MORSHED, M. G. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol. Infect.* **134**, 439–449 (2006).
35. Wizla-derambure, N. *et al.* Familial and Community Environmental Risk Factors for *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **33**, 58–63 (2001).
36. Malaty, H. M., Logan, N. D., Graham, D. Y. & Ramchatesingh, J. E. *Helicobacter pylori* Infection in Preschool and School-Aged Minority Children: Effect of Socioeconomic Indicators and Breast-Feeding Practices. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1387–1392 (2001).
37. Hooi, J. K. Y. *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **153**, 420–429 (2017).
38. Zamani, M. *et al.* Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47**, 868–876 (2018).
39. Dixon, M. F., Genta, R. M., Yardley, J. H. & Correa, P. Classification and grading of gastritis.

The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 1161–1181 (1994).

40. Dixon, M. F., Genta, R. M., Yardley, J. H., Correa, P. & For The International Workshop on t. Histological Classification of Gastritis and *Helicobacter pylori* Infection: An Agreement at Last? *Helicobacter* **2**, 17–24 (1997).

41. Mégraud, F. & Lamouliatte, H. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. *Dig. Dis. Sci.* **37**, 769–772 (1992).

42. Peptic Ulcer Disease: Diagnosis. Available at: https://www.halstedurgery.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Cat_ID=551CDCA7-A3C1-49E5-B6A0-C19DE1F94871&GDL_Disease_ID=80AD1118-6659-4B04-B560-71B95E3B7FA9. (Accessed: 11th September 2018)

43. Wotherspoon, A. C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M. R. & Isaacson, P. G. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* **338**, 1175–1176 (1991).

44. Bayerdörffer, E. *et al.* Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *The Lancet* **345**, 1591–1594 (1995).

45. Varon, C., Mosnier, J.-F., Lehours, P., Matysiak-Budnik, T. & Mégraud, F. Gastric carcinogenesis and *Helicobacter pylori* infection. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **511**, 237–265 (2009).

46. Correa, P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* **52**, 6735–6740 (1992).

47. Howden, C. W. & Leontiadis, G. I. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori*, are they relevant? in *Helicobacter pylori* 315–326 (Springer, Dordrecht, 2000). doi:10.1007/978-94-011-3927-4_35

48. Pietroiusti, A. *et al.* Cytotoxin-Associated Gene-A–Positive *Helicobacter pylori* Strains Are Associated With Atherosclerotic Stroke. *Circulation* **106**, 580–584 (2002).

49. Savarino, V., Sulli, A., Zentilin, P., Raffaella Mele, M. & Cutolo, M. No evidence of an association between *Helicobacter pylori* infection and Raynaud phenomenon. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 1251–1254 (2000).

50. Kemper, R. H., Meijler, W. J., Korf, J. & Ter Horst, G. J. Migraine and function of the immune system: a meta-analysis of clinical literature published between 1966 and 1999. *Cephalalgia Int. J. Headache* **21**, 549–557 (2001).
51. Cecchi, R. & Torelli, E. Schönlein-Henoch purpura in association with duodenal ulcer and gastric *Helicobacter pylori* infection. *J. Dermatol.* **25**, 482–484 (1998).
52. Figura, N. *et al.* The infection by *Helicobacter pylori* strains expressing CagA is highly prevalent in women with autoimmune thyroid disorders. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **50**, 817–826 (1999).
53. Wedi, B. & Kapp, A. *Helicobacter pylori* infection in skin diseases: a critical appraisal. *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 273–282 (2002).
54. Oldenburg, B., Diepersloot, R. J. A. & Hoekstra, J. B. L. High seroprevalence of *Helicobacter pylori* in diabetes mellitus patients. *Dig. Dis. Sci.* **41**, 458–461 (1996).
55. Altschuler, E. Gastric *Helicobacter pylori* infection as a cause of idiopathic parkinson disease and non-arteric anterior optic ischemic neuropathy. *Med. Hypotheses* **47**, 413–414 (1996).
56. Hill, A. B. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc. R. Soc. Med.* **58**, 295–300 (1965).
57. Lind, T. *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. *Helicobacter* **1**, 138–144 (1996).
58. Ducournau, A. *et al.* *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 715–718 (2016).
59. Morelli, G. *et al.* Microevolution of *Helicobacter pylori* during Prolonged Infection of Single Hosts and within Families. *PLoS Genet.* **6**, (2010).
60. Tankovic, J., Lascols, C., Sculo, Q., Petit, J.-C. & Soussy, C.-J. Single and Double Mutations in *gyrA* but Not in *gyrB* Are Associated with Low- and High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3942–3944 (2003).
61. Gerrits, M. M., de Zoete, M. R., Arents, N. L. A., Kuipers, E. J. & Kusters, J. G. 16S rRNA Mutation-Mediated Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2996–3000 (2002).
62. Rokkas, T., Rokka, A. & Portincasa, P. A systematic review and meta-analysis of the role of

- Helicobacter pylori* eradication in preventing gastric cancer. *Ann. Gastroenterol.* **30**, 414–423 (2017).
63. Beveridge, T. J. Mechanism of gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1609–1620 (1990).
64. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620–630 (2015).
65. A M Glauert & Thornley, and M. J. The Topography of the Bacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* **23**, 159–198 (1969).
66. Brown, S., Santa Maria, J. P. & Walker, S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, (2013).
67. Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 686–723 (2003).
68. Zuber, B. *et al.* Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol.* **190**, 5672–5680 (2008).
69. Bayan, N., Houssin, C., Chami, M. & Leblon, G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of Corynebacterium glutamicum cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* **104**, 55–67 (2003).
70. Razin, S. & Hayflick, L. Highlights of mycoplasma research—An historical perspective. *Biologicals* **38**, 183–190 (2010).
71. du Plessis, D. J. F., Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 851–865 (2011).
72. Raetz, C. R. Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* **42**, 614–659 (1978).
73. Epand, R. M. & Epand, R. F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Mol. Biosyst.* **5**, 580–587 (2009).
74. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 133–159 (2016).
75. Geske, T., vom Dorp, K., Dörmann, P. & Hölzl, G. Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in Agrobacterium tumefaciens grown under phosphate deprivation. *Glycobiology* **23**, 69–80 (2013).

76. Contreras, I., Shapiro, L. & Henry, S. Membrane phospholipid composition of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **135**, 1130–1136 (1978).
77. Carlson, R. W. *et al.* The membrane phospholipids of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* as characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. *Microbiology* **146**, 1901–1911 (2000).
78. Lewenza, S. *et al.* The *olsA* gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.* **320**, 95–102 (2011).
79. Olsen, R. W. & Ballou, C. E. Acyl phosphatidylglycerol. A new phospholipid from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **246**, 3305–3313 (1971).
80. Lorenzen, W., Bozhüyük, K. A. J., Cortina, N. S. & Bode, H. B. A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *J. Lipid Res.* **55**, 2620–2633 (2014).
81. Dare, K., Shepherd, J., Roy, H., Seveau, S. & Ibba, M. LysPGS formation in *Listeria monocytogenes* has broad roles in maintaining membrane integrity beyond antimicrobial peptide resistance. *Virulence* **5**, 534–546 (2014).
82. Gidden, J., Denson, J., Liyanage, R., Ivey, D. M. & Lay, J. O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **283**, 178–184 (2009).
83. Hirai, Y. *et al.* Unique cholesteryl glucosides in *Helicobacter pylori*: composition and structural analysis. *J. Bacteriol.* **177**, 5327–5333 (1995).
84. Shimomura, H., Hayashi, S., Yokota, K., Oguma, K. & Hirai, Y. Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**, 407–413 (2004).
85. Testerman, T. L., McGee, D. J. & Mobley, H. L. T. *Helicobacter pylori* Growth and Urease Detection in the Chemically Defined Medium Ham's F-12 Nutrient Mixture. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3842–3850 (2001).
86. Wunder, C. *et al.* Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat. Med.* **12**, 1030–1038 (2006).
87. Kanfer, J. & Kennedy, E. P. Metabolism and Function of Bacterial Lipids I. Metabolism of

- phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **238**, 2919–2922 (1963).
88. Nishijima, M. & Raetz, C. R. Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **254**, 7837–7844 (1979).
89. Green, P. R., Merrill, A. H. & Bell, R. M. Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Purification, reconstitution, and characterization of sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **256**, 11151–11159 (1981).
90. Paoletti, L., Lu, Y.-J., Schujman, G. E., de Mendoza, D. & Rock, C. O. Coupling of Fatty Acid and Phospholipid Synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**, 5816–5824 (2007).
91. DeChavigny, A., Heacock, P. N. & Dowhan, W. Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* **266**, 5323–5332 (1991).
92. Ge, Z. & Taylor, D. E. The *Helicobacter pylori* gene encoding phosphatidylserine synthase: sequence, expression, and insertional mutagenesis. *J. Bacteriol.* **179**, 4970–4976 (1997).
93. Hawrot, E. & Kennedy, E. P. Biogenesis of membrane lipids: mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive phosphatidylserine decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1112–1116 (1975).
94. Salama, N. R., Shepherd, B. & Falkow, S. Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **186**, 7926–7935 (2004).
95. Heacock, P. N. & Dowhan, W. Construction of a lethal mutation in the synthesis of the major acidic phospholipids of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 13044–13049 (1987).
96. Icho, T. & Raetz, C. R. Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J. Bacteriol.* **153**, 722–730 (1983).
97. Icho, T. Membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli*: sequence of the *pgpB* gene and dual subcellular localization of the *pgpB* product. *J. Bacteriol.* **170**, 5117–5124 (1988).
98. Lu, Y.-H., Guan, Z., Zhao, J. & Raetz, C. R. H. Three Phosphatidylglycerol-phosphate Phosphatases in the Inner Membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **286**, 5506–5518 (2011).
99. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008 (2006).

100. Daley, D. O. *et al.* Global Topology Analysis of the Escherichia coli Inner Membrane Proteome. *Science* **308**, 1321–1323 (2005).
101. Touzé, T., Blanot, D. & Mengin-Lecreulx, D. Substrate Specificity and Membrane Topology of Escherichia coli PgpB, an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **283**, 16573–16583 (2008).
102. Hiraoka, S., Nukui, K., Uetake, N., Ohta, A. & Shibuya, I. Amplification and Substantial Purification of Cardiolipin Synthase of *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **110**, 443–449 (1991).
103. Guo, D. & Tropp, B. E. A second *Escherichia coli* protein with CL synthase activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1483**, 263–274 (2000).
104. Tan, B. K. *et al.* Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16504–16509 (2012).
105. Lugtenberg, E. J. J. & Peters, R. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli K12. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **441**, 38–47 (1976).
106. Olofsson, A. *et al.* Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles. *Mol. Microbiol.* **77**, 1539–1555 (2010).
107. Mühlradt, P. F. & Golecki, J. R. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of Salmonella typhimurium. *Eur. J. Biochem.* **51**, 343–352 (1975).
108. Kamio, Y. & Nikaido, H. Outer membrane of Salmonella typhimurium: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**, 2561–2570 (1976).
109. Sankaran, K. & Wu, H. C. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **269**, 19701–19706 (1994).
110. Robins-Browne, R. M. & Hartland, E. L. Escherichia coli as a cause of diarrhea. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 467–475 (2002).
111. Doerrler, W. T., Reedy, M. C. & Raetz, C. R. H. An Escherichia coli Mutant Defective in Lipid Export. *J. Biol. Chem.* **276**, 11461–11464 (2001).
112. Wyckoff, T. J., Lin, S., Cotter, R. J., Dotson, G. D. & Raetz, C. R. Hydrocarbon rulers in UDP-N-acetylglucosamine acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **273**, 32369–32372 (1998).

113. Dotson, G. D., Kaltashov, I. A., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. Expression Cloning of a *Pseudomonas* Gene Encoding a Hydroxydecanoyl-Acyl Carrier Protein-Dependent UDP-GlcNAc Acyltransferase. *J. Bacteriol.* **180**, 330–337 (1998).
114. Sweet, C. R. *et al.* Enzymatic Synthesis of Lipid A Molecules with Four Amide-linked Acyl Chains. *J. Biol. Chem.* **279**, 25411–25419 (2004).
115. Jackman, J. E., Raetz, C. R. & Fierke, C. A. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **38**, 1902–1911 (1999).
116. McClerren, A. L. *et al.* A slow, tight-binding inhibitor of the zinc-dependent deacetylase LpxC of lipid A biosynthesis with antibiotic activity comparable to ciprofloxacin. *Biochemistry* **44**, 16574–16583 (2005).
117. Kelly, T. M., Stachula, S. A., Raetz, C. R. & Anderson, M. S. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 19866–19874 (1993).
118. Babinski, K. J., Ribeiro, A. A. & Raetz, C. R. H. The *Escherichia coli* Gene Encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine Pyrophosphatase of Lipid A Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 25937–25946 (2002).
119. Rubin, E. J. & Trent, M. S. Colonize, evade, flourish: How glyco-conjugates promote virulence of *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes* **4**, 439–453 (2013).
120. Crowell, D. N., Anderson, M. S. & Raetz, C. R. Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**, 152–159 (1986).
121. Garrett, T. A., Kadmas, J. L. & Raetz, C. R. H. Identification of the Gene Encoding the *Escherichia coli* Lipid A 4'-Kinase facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.* **272**, 21855–21864 (1997).
122. Clementz, T. & Raetz, C. R. A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in *Escherichia coli*. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* **266**, 9687–9696 (1991).
123. White, K. A., Kaltashov, I. A., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. A Mono-functional 3-Deoxy-

d-manno-octulosonic Acid (Kdo) Transferase and a Kdo Kinase in Extracts of *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 16555–16563 (1997).

124. Brabetz, W., Lindner, B. & Brade, H. Comparative analyses of secondary gene products of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid transferases from Chlamydiaceae in *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5458–5465 (2000).

125. Clementz, T., Bednarski, J. J. & Raetz, C. R. H. Function of the *htrB* High Temperature Requirement Gene of *Escherichia coli* in the Acylation of Lipid A HtrB catalysed incorporation of laurate. *J. Biol. Chem.* **271**, 12095–12102 (1996).

126. Stead, C. M., Beasley, A., Cotter, R. J. & Trent, M. S. Deciphering the Unusual Acylation Pattern of *Helicobacter pylori* Lipid A. *J. Bacteriol.* **190**, 7012–7021 (2008).

127. Clementz, T., Zhou, Z. & Raetz, C. R. H. Function of the *Escherichia coli* *msbB* Gene, a Multicopy Suppressor of *htrB* Knockouts, in the acylation of Lipid A acylation by *MsbB* follows laurate incorporation by *HtrB*. *J. Biol. Chem.* **272**, 10353–10360 (1997).

128. Li, H. *et al.* Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **21**, 445–461 (2016).

129. Raetz, C. R. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 129–170 (1990).

130. Zhou, Z., White, K. A., Polissi, A., Georgopoulos, C. & Raetz, C. R. Function of *Escherichia coli* *MsbA*, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 12466–12475 (1998).

131. Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002).

132. Hug, I. *et al.* *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide Is Synthesized via a Novel Pathway with an Evolutionary Connection to Protein N-Glycosylation. *PLOS Pathog.* **6**, e1000819 (2010).

133. Reeves, P. R. & Cunneen, M. M. Chapter 18 - Biosynthesis of O-antigen chains and assembly. in *Microbial Glycobiology* (eds. Holst, O., Brennan, P. J., Itzstein, M. von & Moran, A. P.) 319–335 (Academic Press, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374546-0.00018-3

134. Pohl, M. A. *et al.* Host-dependent Lewis (Le) antigen expression in *Helicobacter pylori* cells recovered from Leb-transgenic mice. *J. Exp. Med.* **206**, 3061–3072 (2009).

135. Logan, S. M., Conlan, J. W., Monteiro, M. A., Wakarchuk, W. W. & Altman, E. Functional

- genomics of *Helicobacter pylori*: identification of a beta-1,4 galactosyltransferase and generation of mutants with altered lipopolysaccharide. *Mol. Microbiol.* **35**, 1156–1167 (2000).
136. Moran, A. P. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr. Res.* **343**, 1952–1965 (2008).
137. Alaimo, C. *et al.* Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J.* **25**, 967–976 (2006).
138. Haarmann, R., Ibrahim, M., Stevanovic, M., Bredemeier, R. & Schleiff, E. The properties of the outer membrane localized Lipid A transporter LptD. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 454124 (2010).
139. Sutcliffe, I. C. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **18**, 464–470 (2010).
140. Liechti, G. & Goldberg, J. B. Outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, and *Helicobacter pylori*: paradigm deviations in *H. pylori*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, (2012).
141. Bos, M. P. & Tommassen, J. The LptD Chaperone LptE Is Not Directly Involved in Lipopolysaccharide Transport in *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **286**, 28688–28696 (2011).
142. Li, H. *et al.* The redefinition of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide O-antigen and core-oligosaccharide domains. *PLOS Pathog.* **13**, e1006280 (2017).
143. Mullineaux, C. W., Nenninger, A., Ray, N. & Robinson, C. Diffusion of Green Fluorescent Protein in Three Cell Environments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 3442–3448 (2006).
144. Nanninga, N. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 110–129 (1998).
145. Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S. & Arthur, M. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 307–320 (2008).
146. Badet, B., Vermoote, P., Haumont, P. Y., Lederer, F. & LeGoffic, F. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* **26**, 1940–1948 (1987).
147. Chen, W.-H., Minguez, P., Lercher, M. J. & Bork, P. OGEE: an online gene essentiality database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D901–D906 (2012).
148. Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet, B. & Badet-Denisot, M.-A. Channeling of ammonia in

- glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Mol. Biol.* **313**, 1093–1102 (2001).
149. Mengin-Lecreulx, D. & Heijenoort, J. van. Characterization of the Essential Gene *glmM* Encoding Phosphoglucosamine Mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 32–39 (1996).
150. Jolly, L. *et al.* The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* **179**, 5321–5325 (1997).
151. Shimazu, K. *et al.* Identification of the *Streptococcus gordonii glmM* gene encoding phosphoglucosamine mutase and its role in bacterial cell morphology, biofilm formation, and sensitivity to antibiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 166–177 (2008).
152. De Reuse, H., Labigne, A. & Mengin-Lecreulx, D. The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* **179**, 3488–3493 (1997).
153. Mengin-Lecreulx, D. & van Heijenoort, J. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **176**, 5788–5795 (1994).
154. Hove-Jensen, B. Identification of *tms-26* as an allele of the *gcaD* gene, which encodes N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 6852–6856 (1992).
155. Gehring, A. M., Lees, W. J., Mindiola, D. J., Walsh, C. T. & Brown, E. D. Acetyltransfer Precedes Uridyltransfer in the Formation of UDP-N-acetylglucosamine in Separable Active Sites of the Bifunctional *GlmU* Protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 579–585 (1996).
156. Barreteau, H. *et al.* Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 168–207 (2008).
157. Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., Tanner, J. J. & Beamer, L. J. Quaternary structure, conformational variability and global motions of phosphoglucosamine mutase. *FEBS J.* **278**, 3298–3307 (2011).
158. Christensen, B. G. *et al.* Phosphonomycin: Structure and Synthesis. *Science* **166**, 123–125 (1969).
159. Dhalla, A. M. *et al.* Steady-state kinetic mechanism of *Escherichia coli* UDP-N-

- acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry* **34**, 5390–5402 (1995).
160. Benson, T. E., Marquardt, J. L., Marquardt, A. C., Etzkorn, F. A. & Walsh, C. T. Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry* **32**, 2024–2030 (1993).
161. Heijenoort, J. van. Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **54**, 300–304 (1998).
162. Bouhss, A., Dementin, S., van Heijenoort, J., Parquet, C. & Blanot, D. MurC and MurD Synthetases of Peptidoglycan Biosynthesis: Borohydride Trapping of Acyl-Phosphate Intermediates. in *Methods in Enzymology* (ed. Purich, D. L.) **354**, 189–196 (Academic Press, 2002).
163. Smith, C. A. Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J. Mol. Biol.* **362**, 640–655 (2006).
164. Doublet, P., van Heijenoort, J., Bohin, J. P. & Mengin-Lecreulx, D. The murI gene of Escherichia coli is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J. Bacteriol.* **175**, 2970–2979 (1993).
165. Ho, H. T. *et al.* UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine functions as an activator in the regulation of the Escherichia coli glutamate racemase activity. *Biochemistry* **34**, 2464–2470 (1995).
166. Doublet, P., van Heijenoort, J. & Mengin-Lecreulx, D. The glutamate racemase activity from Escherichia coli is regulated by peptidoglycan precursor UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine. *Biochemistry* **33**, 5285–5290 (1994).
167. Lundqvist, T. *et al.* Exploitation of structural and regulatory diversity in glutamate racemases. *Nature* **447**, 817–822 (2007).
168. Fotheringham, I. G., Bledig, S. A. & Taylor, P. P. Characterization of the Genes Encoding d-Amino Acid Transaminase and Glutamate Racemase, Two d-Glutamate Biosynthetic Enzymes of Bacillus sphaericus ATCC 10208. *J. Bacteriol.* **180**, 4319–4323 (1998).
169. Wipat, A. *et al.* The dnaB-pheA (256°-240°) region of the Bacillus subtilis chromosome containing genes responsible for stress responses, the utilization of plant cell walls and primary metabolism. *Microbiology* **142**, 3067–3078 (1996).
170. Hutton, C. A., Perugini, M. A. & Gerrard, J. A. Inhibition of lysine biosynthesis: an evolving antibiotic strategy. *Mol. Biosyst.* **3**, 458–465 (2007).

171. Wild, J., Hennig, J., Lobočka, M., Walczak, W. & Kłopotowski, T. Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet. MGG* **198**, 315–322 (1985).
172. Strych, U., Huang, H. C., Krause, K. L. & Benedik, M. J. Characterization of the alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr. Microbiol.* **41**, 290–294 (2000).
173. Saito, M. *et al.* Alanine racemase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637: Purification, characterization and gene cloning. *Life Sci.* **80**, 788–794 (2007).
174. Anderson, J. S., Matsushashi, M., Haskin, M. A. & Strominger, J. L. LIPID-PHOSPHOACETYLMURAMYL-PENTAPEPTIDE AND LIPID-PHOSPHODISACCHARIDE-PENTAPEPTIDE: PRESUMED MEMBRANE TRANSPORT INTERMEDIATES IN CELL WALL SYNTHESIS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 881–889 (1965).
175. Struve, W. G. & Neuhaus, F. C. Evidence for an initial acceptor of UDP-NAc-muramyl-pentapeptide in the synthesis of bacterial mucopeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 7 (1965).
176. Chung, B. C. *et al.* Crystal Structure of *MraY*, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis. *Science* **341**, 1012–1016 (2013).
177. van Heijenoort, Y., Gómez, M., Derrien, M., Ayala, J. & van Heijenoort, J. Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of *Escherichia coli*: possible roles of PBP 1b and PBP 3. *J. Bacteriol.* **174**, 3549–3557 (1992).
178. Al-Dabbagh, B. *et al.* Catalytic mechanism of *MraY* and *WecA*, two paralogues of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily. *Biochimie* **127**, 249–257 (2016).
179. Al-Dabbagh, B., Mengin-Lecreulx, D. & Bouhss, A. Purification and Characterization of the Bacterial UDP-GlcNAc:Undecaprenyl-Phosphate GlcNAc-1-Phosphate Transferase *WecA*. *J. Bacteriol.* **190**, 7141–7146 (2008).
180. Salmond, G. P., Lutkenhaus, J. F. & Donachie, W. D. Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell envelope gene *murG*. *J. Bacteriol.* **144**, 438–440 (1980).
181. Crouvoisier, M., Mengin-Lecreulx, D. & van Heijenoort, J. UDP-N-acetylglucosamine:N-

- acetylmuramoyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl undecaprenol N-acetylglucosamine transferase from *Escherichia coli*: overproduction, solubilization, and purification. *FEBS Lett.* **449**, 289–292 (1999).
182. Blaauwen, T. D., Pedro, M. A. D., Nguyen-Distèche, M. & Ayala, J. A. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 321–344 (2008).
183. Mohammadi, T. *et al.* The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **65**, 1106–1121 (2007).
184. Schoenhofen, I. C., McNally, D. J., Brisson, J.-R. & Logan, S. M. Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction. *Glycobiology* **16**, 8C-14C (2006).
185. Rangarajan, E. S. *et al.* Structural and Functional Analysis of *Campylobacter jejuni* PseG. *J. Biol. Chem.* **284**, 20989–21000 (2009).
186. Liu, F. & Tanner, M. E. PseG of Pseudaminic Acid Biosynthesis A UDP-SUGAR HYDROLASE AS A MASKED GLYCOSYLTRANSFERASE. *J. Biol. Chem.* **281**, 20902–20909 (2006).
187. Ha, S., Walker, D., Shi, Y. & Walker, S. The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **9**, 1045–1052 (2000).
188. Bugg, T. D. & Brandish, P. E. From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 255–262 (1994).
189. van Dam, V. *et al.* Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* **64**, 1105–1114 (2007).
190. Ishino, F. *et al.* New mutations fts-36, lts-33, and ftsW clustered in the mra region of the *Escherichia coli* chromosome induce thermosensitive cell growth and division. *J. Bacteriol.* **171**, 5523–5530 (1989).
191. Mercer, K. L. N. & Weiss, D. S. The *Escherichia coli* Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. *J. Bacteriol.* **184**, 904–912 (2002).
192. Sjødt, M. *et al.* Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary

- coupling analysis. *Nature* **556**, 118–121 (2018).
193. Mohammadi, T. *et al.* Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J.* **30**, 1425–1432 (2011).
194. Inoue, A. *et al.* Involvement of an Essential Gene, mviN, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 7298–7301 (2008).
195. Sham, L.-T. *et al.* MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **345**, 220–222 (2014).
196. Fay, A. & Dworkin, J. *Bacillus subtilis* Homologs of MviN (MurJ), the Putative *Escherichia coli* Lipid II Flippase, Are Not Essential for Growth. *J. Bacteriol.* **191**, 6020–6028 (2009).
197. Meeske, A. J. *et al.* MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6437–6442 (2015).
198. Sycuro, L. K. *et al.* Flow cytometry-based enrichment for cell shape mutants identifies multiple genes that influence *Helicobacter pylori* morphology. *Mol. Microbiol.* **90**, 869–883 (2013).
199. Elhenawy, W. *et al.* The O-Antigen Flippase Wzk Can Substitute for MurJ in Peptidoglycan Synthesis in *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **11**, (2016).
200. Terrak, M. *et al.* The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**, 350–364
201. Born, P., Breukink, E. & Vollmer, W. In Vitro Synthesis of Cross-linked Murein and Its Attachment to Sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26985–26993 (2006).
202. Meberg, B. M., Sailer, F. C., Nelson, D. E. & Young, K. D. Reconstruction of *Escherichia coli* mrcA (PBP 1a) Mutants Lacking Multiple Combinations of Penicillin Binding Proteins. *J. Bacteriol.* **183**, 6148–6149 (2001).
203. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008).
204. Spratt, B. G. & Strominger, J. L. Identification of the Major Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* as d-Alanine Carboxypeptidase IA. *J. Bacteriol.* **127**, 660–663 (1976).
205. Scheffers, D.-J. & Errington, J. PBP1 Is a Component of the *Bacillus subtilis* Cell Division Machinery. *J. Bacteriol.* **186**, 5153–5156 (2004).

206. Guinane, C. M., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Contribution of Penicillin-Binding Protein Homologs to Antibiotic Resistance, Cell Morphology, and Virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2824–2828 (2006).
207. Hoskins, J. *et al.* Gene Disruption Studies of Penicillin-Binding Proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**, 6552–6555 (1999).
208. Morlot, C. *et al.* Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 15984–15991 (2005).
209. Boneca, I. G. *et al.* A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1704–1714 (2003).
210. Boneca, I. G. *et al.* Development of Inducible Systems To Engineer Conditional Mutants of Essential Genes of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2095–2102 (2008).
211. El Ghachi, M. *et al.* Characterization of the elongasome core PBP2 : MreC complex of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **82**, 68–86 (2011).
212. Contreras-Martel, C. *et al.* Molecular architecture of the PBP2–MreC core bacterial cell wall synthesis complex. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
213. Fraipont, C. *et al.* Glycosyl Transferase Activity of the *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein 1b: Specificity Profile for the Substrate †. *Biochemistry* **45**, 4007–4013 (2006).
214. Emami, K. *et al.* RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat. Microbiol.* **2**, 16253 (2017).
215. Goffin, C. & Ghuysen, J.-M. Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily Acyltransferases Offer a Clue to the Mycobacterial Paradox: Presence of Penicillin-Susceptible Target Proteins versus Lack of Efficiency of Penicillin as Therapeutic Agent. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 702–738 (2002).
216. Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1641–1648 (2004).
217. Costa, K. *et al.* The Morphological Transition of *Helicobacter pylori* Cells from Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall. *J. Bacteriol.* **181**, 3710–3715 (1999).

218. Chaput, C., Labigne, A. & Boneca, I. G. Characterization of *Helicobacter pylori* Lytic Transglycosylases Slt and MltD. *J. Bacteriol.* **189**, 422–429 (2007).
219. Chaput, C. *et al.* Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape. *PLoS Pathog.* **2**, (2006).
220. Chaput, C. *et al.* Role of the N-Acetylmuramoyl-l-Alanyl Amidase, AmiA, of *Helicobacter pylori* in Peptidoglycan Metabolism, Daughter Cell Separation, and Virulence. *Microb. Drug Resist.* **22**, 477–486 (2016).
221. Sycuro, L. K. *et al.* Relaxation of peptidoglycan cross-linking promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell* **141**, 822–833 (2010).
222. Bonis, M., Ecobichon, C., Guadagnini, S., Prévost, M.-C. & Boneca, I. G. A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. *Mol. Microbiol.* **78**, 809–819 (2010).
223. Sycuro, L. K. *et al.* Multiple Peptidoglycan Modification Networks Modulate *Helicobacter pylori*'s Cell Shape, Motility, and Colonization Potential. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
224. Hughes, R. C. Autolysis of *Bacillus cereus* cell walls and isolation of structural components. *Biochem. J.* **121**, 791–802 (1971).
225. Vollmer, W., Blanot, D., Pedro, D. & A, M. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).
226. Vollmer, W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 287–306 (2008).
227. Vollmer, W. & Tomasz, A. The *pgdA* Gene Encodes for a PeptidoglycanN-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 20496–20501 (2000).
228. Boneca, I. G. *et al.* A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 997–1002 (2007).
229. Vollmer, W. & Born, P. Chapter 2 - Bacterial cell envelope peptidoglycan. in *Microbial Glycobiology* (eds. Holst, O., Brennan, P. J., Itzstein, M. von & Moran, A. P.) 15–28 (Academic Press, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374546-0.00002-X
230. Schneider, T. *et al.* In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge

containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **53**, 675–685 (2004).

231. Bouhss, A. *et al.* Identification of the UDP-MurNAc-Pentapeptide:l-Alanine Ligase for Synthesis of Branched Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **183**, 5122–5127 (2001).

232. Fiser, A., Filipe, S. R. & Tomasz, A. Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.* **11**, 547–553 (2003).

233. Höltje, J. V. From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**, 243–254 (1995).

234. Uehara, T. & Park, J. T. Peptidoglycan Recycling. *EcoSal Plus* **3**, (2008).

235. Templin, M. F., Ursinus, A. & Höltje, J. V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 4108–4117 (1999).

236. Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J. & Park, J. T. Identification of the *mpl* gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **178**, 5347–5352 (1996).

237. Uehara, T. *et al.* Recycling of the Anhydro-N-Acetylmuramic Acid Derived from Cell Wall Murein Involves a Two-Step Conversion to N-Acetylglucosamine-Phosphate. *J. Bacteriol.* **187**, 3643–3649 (2005).

238. Gisin, J., Schneider, A., Nägele, B., Borisova, M. & Mayer, C. A cell wall recycling shortcut that bypasses peptidoglycan de novo biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 491–493 (2013).

239. Gold, M. R., Miller, C. L. & Mishell, R. I. Soluble non-cross-linked peptidoglycan polymers stimulate monocyte-macrophage inflammatory functions. *Infect. Immun.* **49**, 731–741 (1985).

240. Greenblatt, J., Boackle, R. J. & Schwab, J. H. Activation of the alternate complement pathway by peptidoglycan from streptococcal cell wall. *Infect. Immun.* **19**, 296–303 (1978).

241. Kengatharan, K. M., De Kimpe, S., Robson, C., Foster, S. J. & Thiemermann, C. Mechanism of Gram-positive Shock: Identification of Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid Moieties Essential in the Induction of Nitric Oxide Synthase, Shock, and Multiple Organ Failure. *J. Exp. Med.* **188**, 305–315 (1998).

242. Dokter, W. H. *et al.* G(AnH)MTetra, a naturally occurring 1,6-anhydro muramyl dipeptide,

- induces granulocyte colony-stimulating factor expression in human monocytes: a molecular analysis. *Infect. Immun.* **62**, 2953–2957 (1994).
243. Dunn, P. E., Dai, W., Kanost, M. R. & Geng, C. X. Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* **9**, 559–568 (1985).
244. Chamaillard, M. *et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**, 702–707 (2003).
245. Girardin, S. E. *et al.* Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* **300**, 1584–1587 (2003).
246. Girardin, S. E. *et al.* Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* **278**, 41702–41708 (2003).
247. Girardin, S. E. *et al.* Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J. Biol. Chem.* **278**, 8869–8872 (2003).
248. Segal, E. D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L. S. & Falkow, S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7595–7599 (1997).
249. Cantagrel, V. & Lefeber, D. J. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 859–867 (2011).
250. Gross, J. *et al.* The *Haemophilus influenzae* HMW1 Adhesin Is a Glycoprotein with an Unusual N-Linked Carbohydrate Modification. *J. Biol. Chem.* **283**, 26010–26015 (2008).
251. Kelleher, D. J. & Gilmore, R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* **16**, 47R–62R (2006).
252. Lennarz, W. J. & Scher, M. G. Metabolism and function of polyisoprenol sugar intermediates in membrane-associated reactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **265**, 417–441 (1972).
253. Whitfield, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 39–68 (2006).
254. Rahman, A., Barr, K. & Rick, P. D. Identification of the Structural Gene for the TDP-Fuc4NAc:Lipid II Fuc4NAc Transferase Involved in Synthesis of Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **183**, 6509–6516 (2001).

255. Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D. H. & Mengin-Lecreulx, D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 208–233 (2008).
256. Chaykin, S., Law, J., Phillips, A. H., Tchen, T. T. & Bloch, K. Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 998–1004 (1958).
257. Ogura, K., Koyama, T. & Sagami, H. Polyprenyl diphosphate synthases. *Subcell. Biochem.* **28**, 57–87 (1997).
258. Wang, K. C. & Ohnuma, S. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1529**, 33–48 (2000).
259. Shimizu, N., Koyama, T. & Ogura, K. Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases. *J. Biol. Chem.* **273**, 19476–19481 (1998).
260. Apfel, C. M., Takács, B., Fountoulakis, M., Stieger, M. & Keck, W. Use of Genomics To Identify Bacterial Undecaprenyl Pyrophosphate Synthetase: Cloning, Expression, and Characterization of the Essential uppS Gene. *J. Bacteriol.* **181**, 483–492 (1999).
261. Ko, T.-P. *et al.* Mechanism of Product Chain Length Determination and the Role of a Flexible Loop in Escherichia coli Undecaprenyl-pyrophosphate Synthase Catalysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 47474–47482 (2001).
262. Kuo, C.-J. *et al.* Structure-Based Inhibitors Exhibit Differential Activities against Helicobacter pylori and Escherichia coli Undecaprenyl Pyrophosphate Synthases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2008**, (2008).
263. Scholte, A. A., Eubanks, L. M., Poulter, C. D. & Vederas, J. C. Synthesis and biological activity of isopentenyl diphosphate analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 763–770 (2004).
264. Guo, R.-T. *et al.* Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10022–10027 (2007).
265. Siewert, G. & Strominger, J. L. Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 767–773 (1967).
266. Cain, B. D., Norton, P. J., Eubanks, W., Nick, H. S. & Allen, C. M. Amplification of the bacA gene confers bacitracin resistance to Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **175**, 3784–3789 (1993).

267. Ghachi, M. E., Bouhss, A., Blanot, D. & Mengin-Lecreulx, D. The bacA Gene of Escherichia coli Encodes an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 30106–30113 (2004).
268. Bernard, R. BcrC from Bacillus subtilis Acts as an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase in Bacitracin Resistance. *J. Biol. Chem.* **280**, 28852–28857 (2005).
269. Chalker, A. F. *et al.* The bacA gene, which determines bacitracin susceptibility in Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus, is also required for virulence. *Microbiology* **146**, 1547–1553 (2000).
270. Röse, L., Kaufmann, S. H. E. & Daugelat, S. Involvement of Mycobacterium smegmatis undecaprenyl phosphokinase in biofilm and smegma formation. *Microbes Infect.* **6**, 965–971 (2004).
271. Tatar, L. D., Marolda, C. L., Polischuk, A. N., van Leeuwen, D. & Valvano, M. A. An Escherichia coli undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology* **153**, 2518–2529 (2007).
272. Chang, H.-Y., Chou, C.-C., Hsu, M.-F. & Wang, A. H. J. Proposed Carrier Lipid-binding Site of Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **289**, 18719–18735 (2014).
273. Manat, G. *et al.* Membrane Topology and Biochemical Characterization of the Escherichia coli BacA Undecaprenyl-Pyrophosphate Phosphatase. *PLoS ONE* **10**, (2015).
274. El Ghachi, M. *et al.* Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
275. Workman, S. D., Worrall, L. J. & Strynadka, N. C. J. Crystal structure of an intramembranal phosphatase central to bacterial cell-wall peptidoglycan biosynthesis and lipid recycling. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
276. Podlesek, Z. *et al.* Bacillus licheniformis bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol. Microbiol.* **16**, 969–976 (1995).
277. Manson, J. M., Keis, S., Smith, J. M. B. & Cook, G. M. Acquired Bacitracin Resistance in Enterococcus faecalis Is Mediated by an ABC Transporter and a Novel Regulatory Protein, BcrR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3743–3748 (2004).
278. Ohki, R. *et al.* A Bacitracin-Resistant Bacillus subtilis Gene Encodes a Homologue of the

- Membrane-Spanning Subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC Transporter. *J. Bacteriol.* **185**, 51–59 (2003).
279. Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y. & Koga, T. Genes Involved in Bacitracin Resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3756–3764 (2002).
280. Ohki, R. *et al.* The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**, 1135–1144 (2003).
281. Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M. & Denizot, F. YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 93–97 (2003).
282. Ghachi, M. E. *et al.* Crystal structure and biochemical characterization of the transmembrane PAP2 type phosphatidylglycerol phosphate phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2319–2332 (2017).
283. Harel, Y. M., Bailone, A. & Bibi, E. Resistance to Bacitracin as Modulated by an *Escherichia coli* Homologue of the Bacitracin ABC Transporter BcrC Subunit from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **181**, 6176–6178 (1999).
284. Ghachi, M. E., Derbise, A., Bouhss, A. & Mengin-Lecreulx, D. Identification of Multiple Genes Encoding Membrane Proteins with Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase (UppP) Activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 18689–18695 (2005).
285. Stukey, J. & Carman, G. M. Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **6**, 469–472 (1997).
286. Touzé, T., Tran, A. X., Hankins, J. V., Mengin-Lecreulx, D. & Trent, M. S. Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol. Microbiol.* **67**, 264–277 (2008).
287. Fan, J., Jiang, D., Zhao, Y., Liu, J. & Zhang, X. C. Crystal structure of lipid phosphatase *Escherichia coli* phosphatidylglycerophosphate phosphatase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7636–7640 (2014).
288. Suda, Y. *et al.* Chemical Structure of Lipid A from *Helicobacter pylori* Strain 206-1 Lipopolysaccharide. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 1129–1133 (1997).
289. Suda, Y. *et al.* Chemical structure and biological activity of a lipid A component from

- Helicobacter pylori strain 206. *J. Endotoxin Res.* **7**, 95–104 (2001).
290. Moran, A. P., Lindner, B. & Walsh, E. J. Structural characterization of the lipid A component of Helicobacter pylori rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **179**, 6453–6463 (1997).
291. Zhou, Z., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. Lipid A Modifications Characteristic of Salmonella typhimurium Are Induced by NH₄VO₃ in Escherichia coli K12 DETECTION OF 4-AMINO-4-DEOXY-L-ARABINOSE, PHOSPHOETHANOLAMINE AND PALMITATE. *J. Biol. Chem.* **274**, 18503–18514 (1999).
292. Zhou, Z. *et al.* Lipid A modifications in polymyxin-resistant Salmonella typhimurium: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* **276**, 43111–43121 (2001).
293. Kulshin, V. A. *et al.* Structural characterization of the lipid A component of pathogenic Neisseria meningitidis. *J. Bacteriol.* **174**, 1793–1800 (1992).
294. Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. Expression Cloning and Biochemical Characterization of a Rhizobium leguminosarum Lipid A 1-Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**, 39269–39279 (2003).
295. Tran, A. X. *et al.* Periplasmic Cleavage and Modification of the 1-Phosphate Group of Helicobacter pylori Lipid A. *J. Biol. Chem.* **279**, 55780–55791 (2004).
296. Clements, A. *et al.* Secondary Acylation of Klebsiella pneumoniae Lipopolysaccharide Contributes to Sensitivity to Antibacterial Peptides. *J. Biol. Chem.* **282**, 15569–15577 (2007).
297. Tran, A. X. *et al.* The Lipid A 1-Phosphatase of Helicobacter pylori Is Required for Resistance to the Antimicrobial Peptide Polymyxin. *J. Bacteriol.* **188**, 4531–4541 (2006).
298. Tran, A. X., Stead, C. M. & Trent, M. S. Remodeling of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* **11**, 161–166 (2005).
299. Cullen, T. W. *et al.* Helicobacter pylori versus the Host: Remodeling of the Bacterial Outer Membrane Is Required for Survival in the Gastric Mucosa. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
300. Smith, M. F. *et al.* Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for Helicobacter pylori-induced NF- κ B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 32552–32560 (2003).

301. Yokota, S. *et al.* Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 140–148 (2007).
302. Kawahara, T. *et al.* Type I *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide Stimulates Toll-Like Receptor 4 and Activates Mitogen Oxidase 1 in Gastric Pit Cells. *Infect. Immun.* **69**, 4382–4389 (2001).
303. Smith, S. M. *et al.* Tribbles 3: A Novel Regulator of TLR2-Mediated Signaling in Response to *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **186**, 2462–2471 (2011).
304. Behrens, W., Bönig, T., Suerbaum, S. & Josenhans, C. Genome sequence of *Helicobacter pylori* hpEurope strain N6. *J. Bacteriol.* **194**, 3725–3726 (2012).
305. Veyrier, F. J., Ecobichon, C. & Boneca, I. G. Draft Genome Sequence of Strain X47-2AL, a Feline *Helicobacter pylori* Isolate. *Genome Announc.* **1**, (2013).
306. Kimura, A. & Hansen, E. J. Antigenic and phenotypic variations of *Haemophilus influenzae* type b lipopolysaccharide and their relationship to virulence. *Infect. Immun.* **51**, 69–79 (1986).
307. Edwards, N. J. *et al.* Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol. Microbiol.* **35**, 1530–1539 (2000).
308. Manat, G. *et al.* Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microb. Drug Resist.* **20**, 199–214 (2014).