

**Université du Littoral-Côte d'Opale**  
**Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et Biotechnologies LR2B**  
**Equipe « BIOFILM »**  
**2007**



**Habilitation à Diriger des Recherches**

**Annexes**

**Par Irina Sadovskaya**

**Jury :**

<b>M. J-C.Michalski</b>	<b>Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille</b>	<b>Président</b>
<b>Mme M. Caroff</b>	<b>Directrice de Recherche au CNRS, Université de Paris XI</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. A. Filloux</b>	<b>Professeur à l'Université de la Méditerranée</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. A. Peschel</b>	<b>Professeur, Université de Tübingen, Allemagne</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. J. P. O'Gara</b>	<b>Senior Lecturer, University College Dublin, Irlande</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. S. Jabbouri</b>	<b>Professeur à l'Université du Littoral-Côte d'Opale</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. P.Hardouin</b>	<b>Professeur à l'Université du Littoral-Côte d'Opale</b>	<b>Examineur</b>

**Volume 2**  
**Version française**

## TABLE DES MATIERES

### Volume 2

<b>ANNEXE 1. Textes intégraux des articles 6-9</b> .....	2
<b>ARTICLE 6</b> .....	3
<b>ARTICLE 7</b> .....	4
<b>ARTICLE 8</b> .....	5
<b>ARTICLE 9</b> .....	6
<b>ANNEXE 2. Etude structurale des LPS des souches non-type de <i>P. frisingensis</i></b> .....	7
1. Introduction .....	7
1.1. Bactéries du genre <i>Pectinatus</i> . .....	7
1.2. Les lipopolysaccharides (LPS). .....	8
1. 3. Les LPS de <i>Pectinatus</i> spp. ....	9
2. Résultats .....	11
<b>ARTICLE 8</b> .....	13
<b>ARTICLE 9</b> .....	14
<b>ARTICLE 10</b> .....	15
REFERENCES .....	17

### Liste des figures

Figure 1. Paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.....	7
Figure 2. Architecture générale des LPS.....	8
Figure 3. Structure schématique des LPS du type S, R et SR.....	9
Figure 4. Profil DOC-PAGE des LPS isolés des souches de <i>Pectinatus</i> .....	9
Figure 5. Structure de la partie glucidique des LPS des souches <i>P. frisingensis</i> .....	12

## **ANNEXE 1. Textes intégraux des articles 6-9**

*ARTICLE 6*

*ARTICLE 7*

*ARTICLE 8*

*ARTICLE 9*

## ANNEXE 2. Etude structurale des LPS des souches non-type de *P. frisingensis*.

### 1. Introduction

#### 1.1. Bactéries du genre *Pectinatus*.

Les bactéries du genre *Pectinatus* ont été identifiées comme des contaminants de la bière dans les années soixante dix. Le genre *Pectinatus* comprend deux espèces de bactéries : *Pectinatus cerevisiiphilus* et *Pectinatus frisingensis*, qui sont anaérobies strictes et dont l'attribution Gram positif (classe Clostridia, ordre *Clostridiales*, famille des *Acidaminococcaceae*) a été faite génétiquement. Cependant, les parois de ces deux espèces se colorent comme des bactéries à Gram négatif, et possèdent une membrane externe qui contient des lipopolysaccharides (LPS), typiques des bactéries à Gram négatif (Fig. 1).

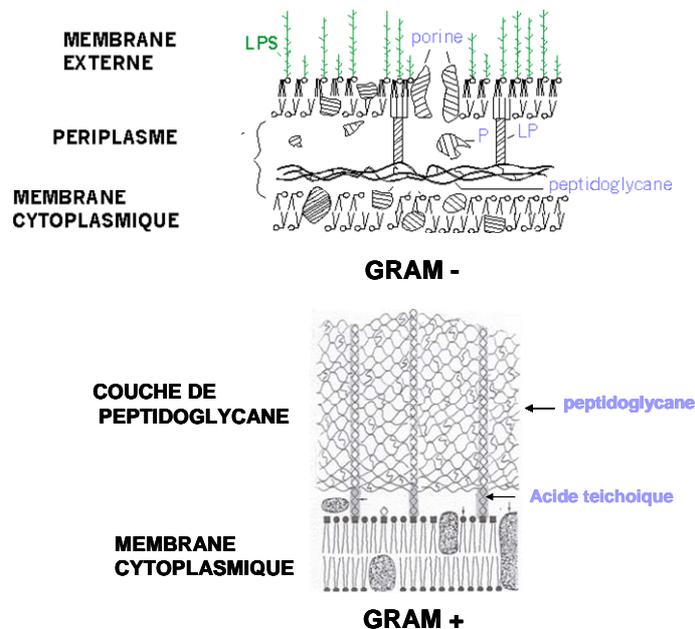
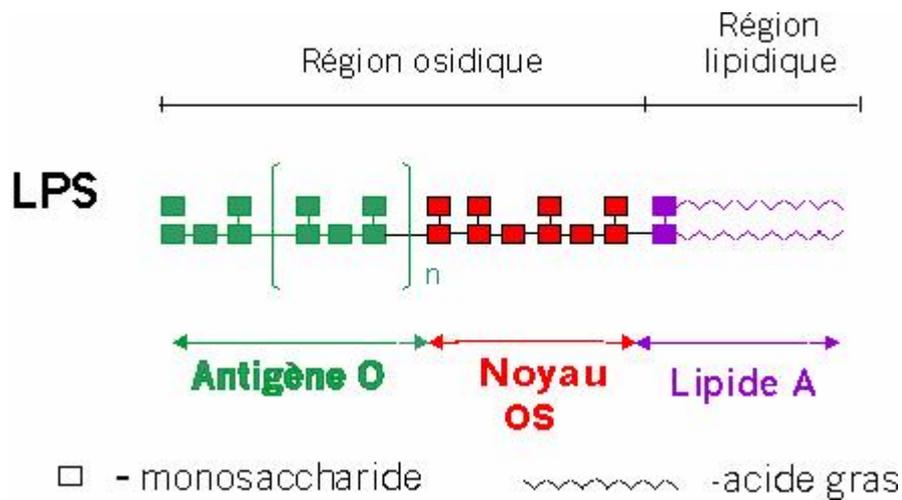


Figure 1. Paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

L'architecture de la paroi de *Pectinatus* ressemble à celle des bactéries à Gram positif, ayant une couche épaisse de peptidoglycane et des invaginations de la membrane cytoplasmique (résumé par (Helander *et al.*, 2004)). La présence des LPS est considérée comme un marqueur des bactéries à Gram négatif. Les microorganismes à Gram positif sont dépourvus de LPS. Les LPS de *Pectinatus* constituent ainsi une exception, ce qui suscite un grand intérêt à l'étude de leur structure.

## 1.2. Les lipopolysaccharides (LPS).



**Figure 2. Architecture générale des LPS**

Comme le suggère leur nom, les LPS sont composés d'un polysaccharide et d'un lipide liés par une liaison covalente. Ils sont généralement constitués de trois parties (Fig. 2) : le lipide A, le noyau (« core oligosaccharide ») et la chaîne O-spécifique (antigène O).

La partie lipidique du LPS, appelée le lipide A, est ancrée dans la membrane externe de la paroi cellulaire par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes avec les phospholipides (Fig. 1).

Le lipide A est lié à un hétéropolysaccharide – le noyau oligosaccharide – par l'intermédiaire d'un sucre original, l'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Le noyau est habituellement composé d'une dizaine de monosaccharides. Il est constitué d'une partie liée directement au lipide A, appelée noyau interne, et d'une partie proche de la chaîne O-spécifique, appelée noyau externe. Le noyau interne est caractérisé par la présence du Kdo et des heptoses, qui peuvent être substitués par des résidus chargés : phosphate, pyrophosphate, éthanolamine (Holst *et al.*, 1998) ou de 4-amino-4-désoxy-arabionose dans le cas du lipide A de *Pectinatus* spp. (Helander *et al.*, 1994). La structure du noyau interne est généralement commune à toutes les espèces bactériennes d'un même genre. Dans plusieurs bactéries, le noyau est lié à la chaîne O-spécifique, qui à son tour est composée des unités répétitives des oligosaccharides (« repeating units »). Les molécules des LPS qui contiennent les antigènes O sont nommées « lisses » (S, « smooth ») ; celles pour lesquelles il manque l'antigène O sont nommées « rugueuses » (R, « rough »). La morphologie des colonies bactériennes est à l'origine de ces dénominations (Hitchcock *et al.*, 1986). Les LPS de type « semi-rough » (SR) possèdent un noyau lié à une seule unité répétitive de la chaîne O-spécifique (Fig. 3).

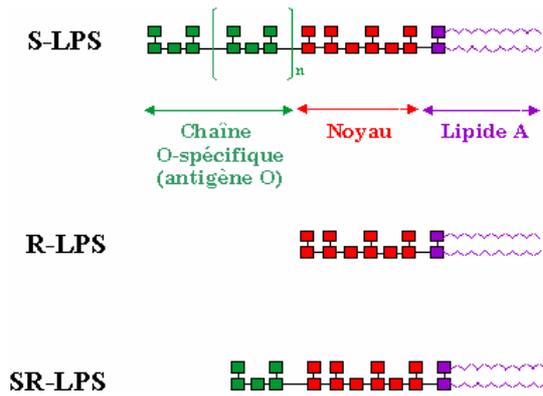


Figure 3. Structure schématique des LPS du type S, R et SR

Puisque le degré de polymérisation de l'antigène O est variable, les LPS du type S sont typiquement constitués d'une famille de molécules ayant des longueurs de chaînes différentes.

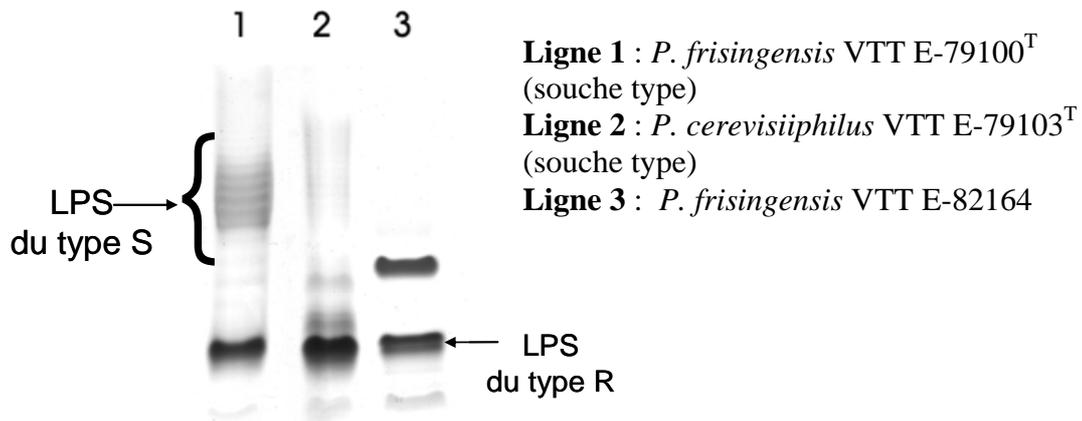


Figure 4. Profil DOC-PAGE des LPS isolés des souches de *Pectinatus*

Cette différence de taille peut être mise en évidence par l'analyse des LPS par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE ou DOC-PAGE).

Les populations des S-LPS avec différents degrés de polymérisation de l'antigène O se présentent comme une multitude de bandes (« ladder-like pattern », ex. Fig. 4, lignes 1 et 2). Les populations des LPS du type R se présentent comme des bandes plus importantes en bas du gel (Fig. 4, ligne 3).

### 1. 3. Les LPS de *Pectinatus* spp.

En 1998-2001, l'étude du stress chez *Pectinatus* était le sujet principal de l'équipe Microbiologie (plus tard – équipe Biofilm) du LR2B. Après être entré dans l'équipe en 2000,

je me suis impliquée dans l'étude des bactéries du genre *Pectinatus* et notamment dans l'élucidation de la structure des molécules fonctionnelles de leur membrane externe—les LPS. Les LPS jouent un rôle important dans la perméabilité de la membrane externe. La connaissance de leur structure est importante pour la compréhension de la survie de ces bactéries dans la bière. En effet, la bière constitue un milieu hostile aux bactéries en raison de nombreux facteurs de stress : des concentrations élevées en alcool et dioxyde de carbone, des valeurs de températures faibles et de pH acide, la présence de substances bactériostatiques de l'houblon.

Les études de la structure des LPS de *Pectinatus* ont été effectués sur deux souches type : *P. cerevisiophilus* ATCC 29359<sup>T</sup> (VTT E-79103<sup>T</sup>) et *P. frisingensis* ATCC 33332<sup>T</sup> (VTT E-79100<sup>T</sup>). Les deux souches possèdent des LPS du type S, et la structure des unités répétitives de leur antigène O a été élucidée (Senchenkova *et al.*, 1995). La structure de la partie lipide A a été également étudiée (Helander *et al.*, 1994), alors que peu de données bibliographiques étaient disponibles sur la structure du noyau.



La collection des cultures VTT (Espoo, Finlande) possède 32 souches de *Pectinatus* isolées à partir de la bière contaminée provenant de Belgique, Finlande, Allemagne, les Pays-Bas et les Etats-Unis, dont 24 de *P. frisingensis* et 8 de *P. cerevisiophilus*. Le criblage de plusieurs souches, différentes des souches types, a démontré que la majorité des souches ne présente que deux bandes distinctes sur gel SDS-PAGE, et est donc dénuée des antigènes O (I.M. Helander, résultats non publiés). Cela indiquerait la présence de deux molécules de LPS distinctes pour chacune des souches.

Sur proposition du Dr. I. M. Helander (Université de Helsinki, Finlande), spécialiste reconnu des LPS de *Pectinatus* spp. et en collaboration avec le Dr. E. Vinogradov (Institut des Sciences Biologiques, National Research Council, Ottawa, Canada) et les Drs. B. O. Petersen, J.Ø. Duus (Carlsberg Laboratory, Copenhague, Danemark), nous avons entrepris l'étude structurale de la partie glucidique des LPS de deux souches « non-type » de *P. frisingensis* de la collection VTT : VTT E-82164 et VTT E-79104. La structure du noyau de la souche type, *P. frisingensis* VTT E-79100<sup>T</sup> a été également étudiée. En plus de la compréhension de l'architecture inhabituelle de ces LPS « non-type » (qui sont en effet les plus répandus dans des isolats de bière, voir ci-dessus), c'était la première étude concernant le noyau des LPS de *Pectinatus* spp.

## 2. Résultats

Les résultats sont présentés dans les articles suivants :

**Vinogradov, E., Petersen, B. O., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., Duus, J. O. & Helander, I. M. (2003).** Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164. *Eur J Biochem* **270**, 3036-3046 (article 10);

**Vinogradov, E., Li, J., Sadovskaya, I., Jabbouri, S. & Helander, I. M. (2004).** The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104. *Carbohydr Res* **339**, 1637-1642 (article 11);

Et dans la revue :

**Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004).** Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*-- lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 543-552 (article 12).

Nous avons montré que le LPS de la souche *P. frisingensis* E-82164 présente deux populations : une contenant une structure glucidique non-répétitive exceptionnellement large, composée de 24 monosaccharides, et une seconde plus courte, composée de 14 monosaccharides. La structure du noyau de la souche type *P. frisingensis* E-79100<sup>T</sup> a également été étudiée. Elle est identique à la structure de 14 monosaccharides à l'exception d'une liaison (Vinogradov *et al.*, 2003), Fig. 5.



*ARTICLE 10*

*ARTICLE 11*

*ARTICLE 12*

### 3. Perspectives

La structure inhabituelle de molécule de LPS (« dual oligosaccharide type ») n'a pas été décrite auparavant et constitue une propriété unique de *Pectinatus*, microorganisme intermédiaire entre les types Gram-positifs et Gram-négatifs. Il serait intéressant de savoir si un tel arrangement de la partie glucidique des LPS est aussi caractéristique d'autres genres attribués à la famille de *Acidaminococcaceae*, ordre *Clostridiales* des bactéries Gram-positifs (*Selenomonas*, *Megasphaera*, *Sporomusa*, *Veillonella* et *Zymophilus*), parmi lesquelles des bactéries anaérobies contaminants de la bière, ou causant des maladies de la cavité buccale. Jusqu'à présent, aucune étude systématique n'a été réalisée sur les LPS de ces espèces. En ce qui concerne les LPS de *P. frisingensis* VTT E-79104 et VTT E-82164 et leur architecture inhabituelle, la voie de biosynthèse de ce genre de LPS présente également un intérêt important.

Malgré le fait que les LPS de deux souches type de *P. cerevisiophilus* et *P. frisingensis* soient de type S, la majorité des isolats étudiés ne possède pas de chaînes O-spécifiques et a des parties glucidiques non-répétitives, comme celles trouvées chez *P. frisingensis* VTT E-82164 et VTT E-79104. Ces données montrent que les chaînes O-spécifiques ne sont pas essentielles pour la survie de ces bactéries dans la bière et dans l'environnement des brasseries.

## REFERENCES

- Helander IM, Kilpelainen I, Vaara M, Moran AP, Lindner B & Seydel U (1994)** Chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides of the genus *Pectinatus*. *Eur J Biochem* **224**: 63-70.
- Helander IM, Haikara A, Sadovskaya I, Vinogradov E & Salkinoja-Salonen MS (2004)** Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*-- lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 543-552.
- Hitchcock PJ, Leive L, Makela PH, Rietschel ET, Strittmatter W & Morrison DC (1986)** Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* **166**: 699-705.
- Holst O, Susskind M, Grimmecke D, Brade L & Brade H (1998)** Core structures of enterobacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res* **397**: 23-35.
- Senchenkova SN, Shashkov AS, Moran AP, Helander IM & Knirel YA (1995)** Structures of the O-specific polysaccharide chains of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis* lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **232**: 552-557.
- Vinogradov E, Petersen BO, Sadovskaya I, Jabbouri S, Duus JO & Helander IM (2003)** Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164. *Eur J Biochem* **270**: 3036-3046.
- Vinogradov E, Li J, Sadovskaya I, Jabbouri S & Helander IM (2004)** The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104. *Carbohydr Res* **339**: 1637-1642.