

TABLE DES MATIERES

<i>Table des matières</i>	<i>I</i>
<i>Abréviations</i>	<i>IX</i>
CHAPITRE I :	1
<i>Introduction et situation du sujet</i>	<i>1</i>
1 Présentation du pathosystème	3
1.1 L'échaudure des feuilles de la canne à sucre	3
1.2 Symptômes	4
1.2.1 Forme chronique	4
1.2.2 Forme aiguë	5
1.2.3 Phase de latence	5
1.2.4 Phase d'éclipse	5
1.3 Transmission	5
1.3.1 Mécanique	5
1.3.2 Aérienne	6
1.4 Méthodes de lutte	6
1.4.1 Sélection de variétés résistantes	6
1.4.2 Contrôle sanitaire	7
1.4.3 Thérapie des boutures	7
1.5 L'agent pathogène : <i>X. albilineans</i>	7
1.5.1 Un <i>Xanthomonas</i> particulier	8
1.5.2 Variabilité de <i>X. albilineans</i>	8
2 Métabolites secondaires	9
2.1 Définitions et généralités	9
2.2 Polycétides et acides gras	10
2.2.1 Polycétides	10
2.2.2 Acides gras	11
2.3 Stéroïdes et terpénoïdes	11
2.3.1 Monoterpénoïdes	12
2.3.2 Sesquiterpénoïdes	12
2.3.3 Diterpénoïdes	12
2.3.4 Caroténoïdes	13
2.4 Alcaloïdes	13
2.4.1 Dérivés de l'ornithine	13
2.4.2 Dérivés de la phénylalanine ou de la tyrosine	14

2.4.3	Dérivés du tryptophane ou indole alcaloïdes.....	14
2.4.4	Dérivés de la quinoline.....	15
2.5	Phénylpropanoïdes.....	15
3	Antibiotiques.....	16
3.1	Définitions et généralités.....	16
3.2	Modes d'action.....	17
3.2.1	Inhibition de la biosynthèse de la paroi.....	17
3.2.1.1	Inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi.....	19
3.2.1.2	Inhibition de l'insertion des unités glycaniques, précurseurs de la paroi, et de la transpeptidation.....	20
3.2.1.3	Inhibition du transfert des précurseurs de la paroi sur un lipide porteur, assurant leur transport à travers la membrane plasmique : la bacitracine.....	22
3.2.1.4	Interférence avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique : polymixine et colistine.....	23
3.2.2	Inhibition de la synthèse protéique.....	23
3.2.2.1	Inhibiteurs spécifiques de la sous unité ribosomale 50S.....	24
3.2.2.2	Inhibiteurs spécifiques de la sous-unité ribosomale 30S.....	28
3.2.2.3	Autres inhibiteurs de la synthèse protéique.....	29
3.2.3	Interférence avec le métabolisme des acides nucléiques.....	30
3.2.3.1	Quinolones et fluoroquinolones.....	31
3.2.3.2	Ansamycines et rifamycines.....	31
3.2.4	Antimétabolites.....	32
3.2.4.1	Sulfonamides et analogues de l'acide folique.....	32
3.2.4.2	Ethambutol et isoniazide.....	33
3.3	Le problème des résistances.....	34
3.3.1	Un souci majeur de santé publique.....	34
3.3.2	Bases moléculaires de la résistance.....	35
3.3.2.1	Résistance innée.....	35
3.3.2.2	Résistance acquise.....	35
3.3.3	Mécanismes de résistance.....	36
3.3.4	Un besoin de nouvelles molécules.....	37
4	Phytotoxines.....	37
4.1	Définitions et généralités.....	37
4.2	<i>Pseudomonas syringae</i>	38
4.2.1	Coronatine.....	38
4.2.2	Syringomycine.....	40
4.2.3	Syringopeptine.....	41
4.2.4	Tabtoxine.....	42
4.2.5	Phaséolotoxine.....	43

4.3	<i>Streptomyces scabies</i> – thaxtomine	44
4.4	<i>Bradyrhizobium</i> spp.– rhizobitoxine	44
4.5	<i>Xanthomonas albilineans</i> – albicidine	45
4.5.1	L'albicidine : une composante majeure du pouvoir pathogène	45
4.5.2	Propriétés antibiotiques	45
4.5.3	Caractéristiques chimiques	45
5	Situation du sujet.....	46
CHAPITRE II :		49
<i>L'albicidine, pathotoxine produite par X. albilineans, est sous la gouvernance d'une région contenant trois gènes de grande taille codant pour des PKS et NRPS ainsi que plusieurs gènes putatifs de modification, de résistance et de régulation</i>		49
Résumé		51
1	Introduction	52
1.1	Les NRPS	53
1.1.1	Structure et fonctionnement d'une NRPS.....	54
1.1.1.1	Domaine d'adénylation	55
1.1.1.2	Domaine PCP ("Peptidyl Carrier Protein").....	57
1.1.1.3	Domaine de condensation	58
1.1.1.4	Domaine thioestérase	59
1.1.1.5	Domaines annexes	60
1.1.1.6	La phosphopantéthéinyl transférase	61
1.1.2	Trois classes de NRPS.....	61
1.2	Les PKS.....	63
1.2.1	Structure et fonctionnement des PKS.....	63
1.2.1.1	Domaine Acyle Transférase (AT).....	64
1.2.1.2	Domaine " Acyl Carrier Protein " (ACP)	65
1.2.1.3	Domaine Cétylosynthase KS.....	65
1.2.1.4	Domaines annexes	66
1.2.1.5	Domaine Thioestérase (TE)	66
1.2.1.6	Les modifications post PKS.....	67
1.2.2	Trois classes de PKS	67
1.3	Les hybrides polycétide-peptide non ribosomal	68
1.3.1	Biosynthèse sans interaction entre PKS et NRPS.....	69
1.3.2	Biosynthèse avec interaction entre PKS et NRPS	69
1.4	Organisation génétique des PKS et NRPS	71
2	Résultats	71

CHAPITRE III :	73
<i>Caractérisation de la région génomique XALB3 impliquée dans la biosynthèse de l'albicidine</i>	73
Résumé	75
1 Introduction	76
1.1 Chaperonnes bactériennes.....	76
1.1.1 GroE.....	77
1.1.2 DnaK/DnaJ.....	77
1.1.3 Les autres chaperonnes procaryotes et leur fonction.....	78
1.1.3.1 <i>IbpA</i> et <i>IbpB</i>	79
1.1.3.2 Les protéases Clp.....	79
1.1.3.3 Le système SecB.....	79
1.1.3.4 SRP, “ Signal Recognition Particle ”.....	80
1.1.3.5 HtpG.....	80
2 Résultats	81
 CHAPITRE IV :	83
<i>Expression d'albicidine en système hétérologue</i>	83
Résumé	85
1 Introduction	86
1.1 Expression hétérologue des PKS et des NRPS.....	86
1.1.1 Modifications post traductionnelles.....	87
1.1.2 Disponibilité du substrat.....	88
1.1.3 Modifications post mégasynthase.....	88
1.1.4 Résistance.....	89
1.1.5 Export.....	89
1.2 Ingénierie métabolique des PKS et NRPS.....	90
1.2.1 Mutagenèse de domaines.....	90
1.2.2 Altération des liaisons inter-modules.....	91
1.2.3 Biosynthèse mutationnelle : Mutasynthèse.....	91
1.2.4 Combinaison d'altérations.....	92
1.2.5 Altération des modifications post PKS.....	92
2 Résultats	92

CHAPITRE V :	93
Conclusions et perspectives	93
1 Conclusions	95
1.1 Organisation génétique des gènes <i>ablI</i> , <i>albIV</i> et <i>albIX</i>	95
1.2 Caractérisation de la région XALB3	95
1.3 Production d'albicidine en système hétérologue	97
2 Perspectives	98
2.1 Surexpression d'albicidine	98
2.2 Elucidation du rôle de l'albicidine dans la pathogénèse.....	100
2.3 Caractérisation des substrats des NRPS	100
2.4 Ingénierie métabolique	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103

TABLE DES ILLUSTRATIONS

A. FIGURES

Figure 1 : Différentes possibilités de cyclisation d'un polycétide	11
Figure 2 : Condensation de deux molécules d'isoprène pyrophosphate.....	12
Figure 3 : Biosynthèse de la nicotine à partir d'ornithine et d'acide nicotinique	13
Figure 4 : Comparaison des structures de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif	18
Figure 5 : Mode d'action de différents inhibiteurs de la biosynthèse du peptidoglycane	19
Figure 6 : Analogie structurale entre la cyclosérine et la D-alanine	19
Figure 7 : Structure de la fosfomycine.....	20
Figure 8 : Structure des différentes familles de β Lactames.....	21
Figure 9 : Structure de la vancomycine	22
Figure 10 : Structure de la bacitracine.....	23
Figure 11 : Mode d'action de différents inhibiteurs de la synthèse protéique.....	24
Figure 12 : Structure de l'érythromycine A.....	25
Figure 13 : Structure de la lincosamine.....	26
Figure 14 : Structure des noyaux de synergistines	26
Figure 15 : Structure du chloramphénicol.....	27
Figure 16 : Structure du linezolid.	27
Figure 17 : Structure de l'hydrochlorure de tétracycline.....	28
Figure 18 : Structure de différents aminoglycosides	29
Figure 19 : Structure de l'acide fusidique et de la mupirocine	30
Figure 20 : Structure de la pulvomycine.....	30
Figure 21 : Structure de l'acide nalidixique.....	31
Figure 22 : Structure de la rifampicine	32
Figure 23 : Comparaison de la structure de l'acide folique avec celle d'inhibiteurs du métabolisme THF.....	33
Figure 24 : Structure de l'étambuthol.....	33
Figure 25 : Schéma des voies de biosynthèse de la coronatine	39
Figure 26 : Structure de la syringomycine, de la syringostatine, de la syringotoxine et de la pseudomycine.....	40
Figure 27 : Structure des formes SP22 et SP25 de la syringopeptine	42
Figure 28 : Structure de la tabtoxine.....	43
Figure 29 : Fonctionnement schématisé d'une NRPS.....	55
Figure 30 : Mécanisme de catalyse d'un domaine C.....	59
Figure 31 : Organisation en domaines de la 6-déoxyerythronoline synthétase.....	64
Figure 32 : Mécanisme de formation de la liaison C-C catalysée par un module KS d'une PKS.....	66

B. TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats des tests de complémentation des mutants *tox⁻* par les cosmides de la banque génomique de *Xa23R1* 47

Tableau 2 : Modèle prédictif du code non ribosomal 57

Tableau 3 : Premiers systèmes PKS et NRPS transférés en systèmes hétérologues 87

Rapport-Gratuit.com

ABREVIATIONS

A	Domaine d'adénylation
ACP	" Acyl Carrier Protein "
ADN	Acide désoxyribonucléique
AL	Domaine "Aryl ligase "
Alb	Albicidine
Alb ^{S/R}	Phénotype de sensibilité/résistance à l'albicidine
Ap	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
b	Bases
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool "
C	Domaine de condensation
CoA	CoenzymeA
CP	"Carrier Protein "
Cy	Domaine de cyclisation
dNTP	Désoxynucleotides triphosphate
DH	Domaine déhydratase
E	Domaine d'énoylation
kb	Kilobases
KR	Domaine cétoréductase
KS	Domaine cétosynthase
M	Molaire, mol.l ⁻¹
NRP	"Non ribosomal peptide" (Peptide non ribosomal))
NRPS	"Non ribosomal peptide synthase" (Peptide non ribosomal synthétase)
ORF	"Open reading frame" (Cadre ouvert de lecture)
Ox	Domaine d'oxydation
pb	Paires de bases
PCP	Domaine "Peptidyl Carrier Protein"
PK	Polycétide
PKS	Polycétide synthétase
Ppant	Phosphopantéthéinyl
pv.	Pathovar
spp.	Espèce
TE	Domaine thioestérase

CHAPITRE I :

INTRODUCTION ET SITUATION DU SUJET

Les métabolites secondaires des plantes et des micro-organismes ont joué un rôle prépondérant dans le développement de la chimie organique et de la pharmacie moderne. Les propriétés biologiques de ces composés sont à l'origine du développement de nombreux médicaments. Ainsi, on estime que plus de 40% de l'arsenal thérapeutique trouverait son origine dans ces métabolites (Hanson, 2003). Les antibiotiques, qui constituent une des avancées thérapeutiques les plus importantes des cinquante dernières années, sont des métabolites secondaires de micro-organismes. Cependant, leur utilisation systématique a conduit à l'apparition de résistances. Ce phénomène limite de plus en plus leurs applications et souligne l'importance de la découverte de nouvelles molécules. Des programmes de recherche alliant génomique fonctionnelle et chimie analytique visent à identifier de nouveaux composés actifs et à en disséquer les voies de biosynthèse. Ces programmes sont en particulier développés sur les actinomycètes, qui sont la principale source d'antimicrobiens (Rawlings, 1999, 2001a & b). Cependant, d'autres microorganismes présentent un potentiel important pour la découverte de nouveaux composés actifs. Ainsi, *Xanthomonas albilineans*, une bactérie phytopathogène responsable de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre produit une toxine présentant des propriétés antibiotiques, l'albicidine. Cette toxine et ses voies de biosynthèse font l'objet de ce manuscrit.

1 Présentation du pathosystème

1.1 L'échaudure des feuilles de la canne à sucre

L'échaudure des feuilles de la canne à sucre (" leaf scald " en anglais) est une bactériose vasculaire provoquée par *Xanthomonas albilineans*. La canne à sucre est l'hôte principal de *X. albilineans*, mais d'autres *Poaceae* comme le maïs ou des graminées sauvages poussant à proximité des plantations de canne (*Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum* spp., *Pennisetum purpureum* et *Rottboelia cochinchinensis*) ont été décrits comme hôtes occasionnels de la bactérie (Orian, 1942). La survie de *X. albilineans* est faible en dehors de la plante hôte et la bactérie ne se multiplie apparemment que chez ces hôtes. La présence naturelle et fréquente des hôtes sauvages dans les zones de production de canne à sucre pourrait expliquer pourquoi la maladie n'a jamais pu être éliminée une fois installée dans un terroir donné (Ricaud *et al.*, 1989). Les répercussions

économiques de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre peuvent être très graves lorsque des variétés sensibles sont touchées, en particulier lorsque la maladie touche une zone de production pour la première fois ou lorsqu'une nouvelle souche apparaît (Rott *et al.*, 1995). Le premier signalement de la maladie remonte à 1911 en Australie par North. Cependant, elle serait apparue aux îles Fidji dès 1908, voire auparavant (Martin & Robinson, 1961). A ce jour, plus de 60 pays sont concernés par l'échaudure des feuilles (Rott & Davis, 2000).

1.2 Symptômes

La symptomatologie sur la canne à sucre se présente sous deux formes : une forme chronique et une forme aiguë. Deux phases, une phase d'éclipse et une phase de latence, sont également associées au développement de la maladie.

1.2.1 *Forme chronique*

La principale caractéristique de la forme chronique est la présence au niveau du feuillage de lignes blanches ou chlorotiques parallèles aux nervures. Ces stries peuvent varier d'une ligne étroite comme un trait de crayon à une bande d'un centimètre de large s'allongeant graduellement le long du limbe. La couleur de la strie varie alors du blanc jaunâtre sur le limbe pour prendre une teinte violacée au niveau de la gaine. En vieillissant, la strie peut virer vers une teinte rougeâtre. Les lignes foliaires constituent le seul symptôme externe se développant sur les variétés résistantes.

En s'intensifiant, la maladie se manifeste par des stries plus larges et plus diffuses, notamment sur les feuilles vieillissantes. Le tissu foliaire blanchit, pouvant déboucher sur un blanchiment et une chlorose du feuillage entier. La décoloration du limbe est accompagnée d'un dessèchement de l'extrémité des feuilles qui finissent par se recourber vers l'intérieur donnant à la pousse un aspect en fuseau. Pour les tiges plus âgées, la forme chronique se caractérise particulièrement par le développement simultané de bourgeons auxiliaires ou ailerons, sans effet de dominance apicale. C'est ainsi que les jeunes pousses issues des bourgeons de la base de la tige sont les plus développées. Ces pousses présentent les mêmes symptômes que le feuillage de la tige. En section longitudinale, la tige malade présente un rougissement caractéristique des vaisseaux au niveau des nœuds voire des entre-

nœuds. Les symptômes sur hôtes occasionnels sont généralement restreints à de petites bandes de chlorose ou aux classiques lignes blanches en trait de crayon.

1.2.2 Forme aiguë

La forme aiguë se manifeste par un flétrissement soudain des cannes arrivées à maturité. Ce phénomène peut s'observer sur des cannes apparemment saines ne présentant aucun symptôme de la forme chronique. Le dépérissement des cannes, semblable à un dessèchement de la plante, se produit souvent après un épisode pluvieux suivi d'une période de sécheresse prolongée. Toutefois, ce type de phénomène reste réservé aux variétés les plus sensibles.

1.2.3 Phase de latence

La phase de latence constitue l'un des principaux obstacles à la lutte contre l'échaudure des feuilles. En effet, la plante peut tolérer l'agent pathogène pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois sans présenter de symptômes, ou alors ne présenter que quelques discrètes lignes blanches foliaires pouvant échapper au champ, à l'attention de l'observateur (Rott *et al.*, 1986 ; Ricaud *et al.* 1989). Cette phase de latence prend fin pour des raisons encore inconnues.

1.2.4 Phase d'éclipse

Cette phase peut être concomitante à la phase de latence. C'est ainsi qu'au cours de la croissance de la canne à sucre, les lignes blanches foliaires caractéristiques apparaissent puis disparaissent. Elles ne sont plus visibles après la sénescence et la mort des feuilles âgées, et les feuilles plus jeunes ne présentent pas de symptômes. Un même plant peut alors apparaître sain ou infecté selon la date d'inspection.

1.3 Transmission

1.3.1 Mécanique

La transmission de la maladie au champ a lieu principalement lors de la récolte par l'utilisation de matériel de coupe contaminé (lames des coupeuses ou des couteaux). La maladie est également transmise par les boutures de canne à sucre. Ainsi, la phase de latence a largement contribué à la dissémination de l'agent pathogène. En effet, des boutures de plants apparemment sains, mais infectés, peuvent être

disséminées d'une zone de production à une autre, tant à l'échelle de la parcelle qu'au niveau mondial.

1.3.2 Aérienne

Une contamination aérienne de la canne à sucre a par ailleurs été rapportée à Maurice et en Guadeloupe dans les années 1990. Cette observation a coïncidé avec une ré-émergence de la maladie dans l'arc caribéen ainsi qu'à Maurice. L'existence d'une phase épiphyte dans le cycle infectieux a depuis été confirmée (Klett, 1994 ; Daugrois *et al.*, 2003). Cette phase est associée à des symptômes atypiques de la maladie, tels que des lésions nécrotiques brunes se prolongeant par une strie ou une ligne blanche. Sous certaines conditions climatiques, la phase épiphyte peut contribuer à la dissémination aérienne de la bactérie et à la contamination de cannes saines.

1.4 Méthodes de lutte

Les pratiques culturales de la canne à sucre rendent cette culture particulièrement sensible aux maladies du fait d'un certain nombre de spécificités : i) les épidémies sont facilitées dans un contexte de monoculture sur de grandes surfaces agricoles; ii) la propagation des agents pathogènes est facilitée par la multiplication végétative par bouturage; et iii) la sélection variétale est longue et difficile, notamment à cause du caractère pluriannuel de la culture. Les méthodes de lutte contre l'échaudure des feuilles sont essentiellement préventives car aucun moyen de lutte chimique n'est utilisé à l'heure actuelle.

1.4.1 Sélection de variétés résistantes

L'échaudure des feuilles a causé d'importantes pertes au champ au début du 20^e siècle sur des cultures de cannes nobles (*S. officinarum*). L'introduction de variétés résistantes (hybrides interspécifiques *S. spontaneum* X *S. officinarum*) a permis de contenir la maladie. Cependant, des recrudescences fréquentes, dont les causes demeurent mal connues, ont été reportées. La sélection et l'utilisation de variétés résistantes restent les moyens de lutte les plus efficaces. L'identification de variétés sensibles et leur élimination au cours des processus de sélection variétale sont par conséquent essentielles. La culture exclusive de plantes résistantes est cependant difficile à accomplir et doit être accompagnée de mesures prophylactiques telles que l'élimination du matériel végétal infecté, le nettoyage et la désinfection des outils de

coupe en pépinières, les contrôles sanitaires et la production de matériel de plantation sain.

1.4.2 Contrôle sanitaire

La prise de mesures drastiques concernant l'import de matériel végétal est un autre moyen de lutte capital contre l'échaudure des feuilles. Cette mesure tombe sous le sens pour les zones de production où la maladie n'est pas présente, mais elle s'avère également très utile dans une zone déjà atteinte par la maladie dans laquelle il ne faut pas introduire de nouvelles souches de l'agent pathogène pouvant présenter une agressivité accrue. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de la quarantaine canne à sucre du CIRAD à Montpellier. Celle-ci fournit des variétés traitées, testées et assainies après passage par les deux cycles de quarantaine d'un an.

1.4.3 Thermothérapie des boutures

Cette méthode est basée sur la destruction des bactéries par la chaleur dans les tissus infectés. Elle consiste en un trempage des boutures dans de l'eau à température ambiante durant 48 heures suivi d'un bain dans de l'eau chauffée à 50°C. Cette mesure n'est toutefois pas toujours compatible avec la taille des surfaces agricoles plantées de canne à sucre, son utilisation est par conséquent restreinte aux pépinières (Rott, 1995). Ainsi, les pépinières, dont le rôle est de fournir des boutures de canne aux planteurs, constituent également une étape cruciale du contrôle de la maladie.

1.5 L'agent pathogène : X. albilineans

Wilbrink (1920) et North (1926) ont été les premiers à démontrer le rôle d'une bactérie invasive du xylème dans l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Baptisée initialement *Bacterium albilineans* par Ashby (1940), cette bactérie aérobie, Gram négatif, non sporulante, en forme de bâtonnet mono-flagellé, et produisant un pigment jaune, a été assignée au genre *Xanthomonas* (Dowson, 1943). Des études de microscopie optique ont confirmé que la bactérie demeurait confinée aux vaisseaux du xylème et aux espaces intercellulaires adjacents, et que les chloroplastes des tissus chlorotiques étaient de petite taille et désorganisés. Des études ultra-structurales ont permis de confirmer ces résultats et de montrer que seuls des proplastides (et non des chloroplastes) étaient présents dans les tissus

chlorotiques adjacents aux vaisseaux du xylème colonisés (Birch & Patil, 1983 et Birch, 2001).

1.5.1 Un *Xanthomonas* particulier

Bien que présentant les caractéristiques du genre *Xanthomonas*, *X. albilineans* se distingue des autres espèces de *Xanthomonas* par un spectre caractéristique de résistance aux antibiotiques, par une production de mucus très faible, et un temps de génération élevé (il faut compter 4 à 5 jours pour voir apparaître une colonie sur milieu gélosé sucrose-peptone, alors que 24 heures sont suffisantes pour la plupart des autres *Xanthomonas* ; Vauterin *et al.*, 1993). Typiquement, les colonies de *X. albilineans* sur milieu gélosé sont circulaire, convexes, lisses, brillantes et translucides, d'une teinte jaune miel qui fonce lorsque la culture vieillit. Par ailleurs, la présence de gènes *avr* ou de gènes *hrp* n'a pas pu être démontrée par recherche de séquences homologues de ces gènes, issus d'autres espèces de *Xanthomonas*, ni d'autres genres bactériens (Leite *et al.*, 1994 ; Costet *et al.*, 2002). Pour mémoire, les gènes *avr* et *hrp* codent pour des déterminants de pathogénie majeurs contrôlant les interactions entre plantes et bactéries phytopathogènes Gram négatif (Bogdanove *et al.*, 1996). *X. albilineans* produit un complexe de pathotoxines dont la composante majeure est l'albicidine. L'albicidine est une composante essentielle du pouvoir pathogène de *X. albilineans* et cette toxine présente également des propriétés antibiotiques. La biosynthèse de l'albicidine faisant l'objet de ce manuscrit, nous y reviendrons plus en détail section 4.5 et dans les chapitres suivants.

1.5.2 Variabilité de *X. albilineans*

La notion de variabilité d'un agent pathogène prend toute son importance lorsqu'il est envisagé de mettre au point des méthodes de diagnostic, en particulier lorsque le diagnostic direct *in planta* est insuffisant. *X. albilineans* a fait l'objet de plusieurs études de variabilité biochimique et immunologique. Ainsi, trois groupes de protéines membranaires (65 souches), trois groupes d'esters d'acide gras (65 souches) et trois sérovars (218 souches) ont été décrits à l'aide de souches d'origines géographiques différentes (Rott *et al.*, 1996). Toutefois, la corrélation entre les groupes obtenus avec ces marqueurs est faible. D'autre part, une recrudescence de l'échaudure des feuilles constatée à la fin des années 1980 en Guadeloupe, en Floride, en Louisiane, à Maurice, à Taiwan et au Texas a conduit Davis et collaborateurs à mener une

analyse de diversité génétique chez *X. albilineans* (Davis *et al.*, 1997). A partir d'une collection de 218 souches sauvages, issues de 31 zones géographiques, huit groupes génétiques distincts ont été identifiés par RFLP en électrophorèse en champs puisé. Cette étude a également permis de mettre en évidence que la recrudescence de la maladie était liée à des souches de *X. albilineans* appartenant toutes à un même groupe. Ces résultats ont été confirmés par une étude plus récente de variabilité RFLP, utilisant cette fois-ci non pas des marqueurs neutres, mais des marqueurs génétiques impliqués dans le pouvoir pathogène : les gènes de biosynthèse de l'albicidine (Champoiseau *et al.*, 2005).

L'albicidine étant un métabolite secondaire, nous nous intéresserons dans un premier temps à ces métabolites particuliers avec un intérêt pour ceux ayant des propriétés antibiotiques.

2 Métabolites secondaires

2.1 Définitions et généralités

Les plantes et les micro-organismes produisent de très nombreuses molécules aux structures variées. Plus de 100 000 substances naturelles sont répertoriées et il en existe peut-être cinq fois plus (Waterman, 2001). Ces molécules biologiques peuvent être divisées en deux catégories : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Alors que l'on retrouve les métabolites primaires (nucléotides, acides aminés naturels, sucres simples etc.) et leurs polymères (acides nucléiques, protéines, mais également cellulose et lignine chez les plantes) dans toute cellule vivante, les métabolites secondaires sont spécifiques d'un petit nombre d'espèces (Hanson, 2003).

Les métabolites secondaires ont plusieurs caractéristiques : 1) leur production n'est pas indispensable à la croissance de l'organisme qui les synthétise ; 2) ils sont généralement produits en faible quantité ; 3) ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses ; 4) ils sont souvent actifs sous forme de mélange de molécules structurellement très proches et appartenant à une même famille chimique ; 5) ils possèdent des voies de biosynthèse propres, à partir de produits du métabolisme primaire ; 6) leur biosynthèse est dirigée par un ensemble de gènes

auxquels sont souvent associés des gènes de régulation et de résistance; 7) ils ne sont généralement produits que par un nombre limité d'organismes et enfin 8) ils exercent généralement leur activité biologique sur un autre organisme. Un intérêt croissant est porté vers ces métabolites car on estime à 40% la proportion de médicaments originaires de métabolites secondaires. Un grand nombre de métabolites secondaires dérivent de peptides dont la diversité de structure est due, en partie, à la présence de résidus non protéinogènes (c'est-à-dire différents des 20 acides aminés constitutifs des protéines). Plus de 300 résidus non protéinogènes ont été identifiés à ce jour (Ackerley *et al.*, 2003).

Le classement des métabolites secondaires sur une base structurale est difficile tant la variété de structure de ces molécules est grande. On peut toutefois dégager des grandes familles que sont i) les polycétides et les acides gras, ii) les terpénoïdes et les stéroïdes, iii) les phénylpropanoïdes, iv) les alcaloïdes et v) le reste (Vinings, 1990).

2.2 Polycétides et acides gras

2.2.1 Polycétides

Les polycétides sont élaborés par condensation séquentielle de molécules d'acétate, à partir d'acyl co-enzyme A par des mégasynthases modulaires appelées PKS ("polyketide synthases" Pfeifer & Khosla, 2001). Il en résulte généralement des molécules à $2n$ atomes de carbone où un carbonyle (cétone originaire du groupement carboxyle de l'acétate) est alterné avec un méthylène [originaire du groupement méthyle de l'acétate soit une structure de type $(CO-CH_2-CO-CH_2)_n$]. Les mécanismes de biosynthèse des polycétides sont traités au chapitre III de ce manuscrit, et ne seront par conséquent pas détaillés ici. Il est néanmoins à noter que la structure des polycétides peut être complexifiée étant donné qu'une réaction de condensation entre deux carbonyles d'une même molécule peut aboutir à la formation d'un cycle à 6 carbones (hydroxycétone) et à l'obtention d'un noyau phénol par énoilisation du polycarbonyle (Figure 1)

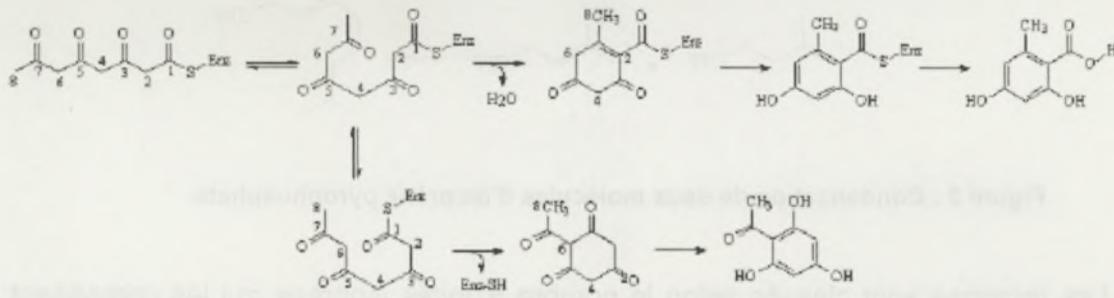


Figure 1 : Différentes possibilités de cyclisation d'un polycétide

Enfin, un degré de complexité supplémentaire provient du fait que le squelette polycétidique peut être modifié par méthylation, décarboxylation, réduction ou oxydation pour aboutir à une extraordinaire variabilité de structure des molécules appartenant à cette famille. D'un point de vue thérapeutique, de nombreux antibiotiques ainsi que des toxines microbiennes sont dérivés de polycétides (macrolactones et tétracyclines pour les antibiotiques ou aflatoxines produites par *Aspergillus flavus*)

2.2.2 Acides gras

De manière similaire, les acides gras que l'on retrouve sous forme d'acides libres mais surtout estérifiés avec du glycérol ou du cholestérol (lipides) dérivent également de molécules d'acétate, mais par l'action d'une enzyme appelé FAS ("Fatty Acid Synthase"). Chaque étape d'élongation est suivie d'une réduction du thioester proximal aboutissant à une structure du type acide alcanoïque : $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$. Outre leur fonction dans l'architecture membranaire, les acides gras sont également les précurseurs de nombreux métabolites secondaires (acide jasmonique et molécules antifongiques chez les plantes, hormones de type prostaglandines, antibiotique de type mycomycine, etc...)

2.3 Steréoides et terpénoïdes

Les terpènes ont une structure en C_5 , C_{10} , C_{15} , C_{20} etc. résultant de la condensation de monomères de type isoprène (une chaîne à 5 atomes de carbone ramifiée au niveau du carbone β) qui sont liés de façon covalente par leurs extrémités à partir d'isoprène pyrophosphate (Figure 2) (McGarvey *et al.*, 1995).

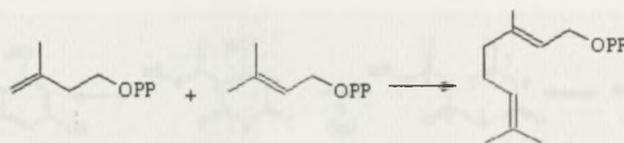


Figure 2 : Condensation de deux molécules d'isoprène pyrophosphate

Les terpènes sont classés selon le nombre d'unités isoprène qui les composent; on distingue ainsi les monoterpénoïdes en C₁₀ (soit 2 chaînes en C₅), les sesquiterpénoïdes (C₁₅), les diterpénoïdes (C₂₀), le sesterterpénoïdes (C₂₅) les triterpénoïdes (C₃₀) et les caroténoïdes (C₄₀). Les terpènes dont le nombre de carbone n'est pas un multiple de cinq sont appelés stéroïdes. La plupart des terpénoïdes sont cyclisés par catalyse acide.

2.3.1 Monoterpénoïdes

D'un point de vue fonctionnel, les monoterpénoïdes constituent la majeure partie des arômes des plantes qui sont des composés volatils (menthol, camphre, géraniol, etc. Grayson , 2000).

2.3.2 Sesquiterpénoïdes

Parmi les sesquiterpènes dont l'activité est remarquable, notons l'artémisinine, extrait du quingaoshu (*Artemisia annua*) une plante aux propriétés anti-pyréiques de la pharmacopée traditionnelle chinoise, dont l'efficacité contre *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme, a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à recommander l'usage dans les thérapies contre des souches de *P. falciparum* chimiorésistantes (Sriram *et al.*, 2004).

2.3.3 Diterpénoïdes

Un certain nombre de diterpénoïdes possèdent une activité anti-cancéreuse, le plus connu d'entre eux est très certainement le Taxol, extrait à l'origine de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*) mais dont la production est faite par voie semi synthétique à partir de taxanes dont l'obtention est plus aisée (Patel *et al.*, 1998). Ce composé est utilisé dans les thérapies des cancers du sein et de l'ovaire. A l'opposé, un certain nombre de diterpénoïdes synthétisés par des plantes de la famille des euphorbes ont une activité co-carcinogène et irritante.

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

12



2.3.4 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments que l'on retrouve chez de nombreux végétaux (β carotène de la carotte ou lycopène, le pigment rouge de la tomate). Ce sont des précurseurs de la vitamine A qui jouent un rôle central dans la vision. Les caroténoïdes ont des propriétés anti-oxydantes qui leur ont valu un vif intérêt, notamment comme alicaments (Fraser & Bramley, 2004).

2.4 Alcaloïdes

Ces métabolites secondaires ont été les premières substances naturelles isolées des plantes médicinales au début du vingtième siècle. Leur nom d'alcalins végétaux puis d'alkaloïdes découle de leur capacité à former des sels en présence d'acides. Le dénominateur commun de la structure des alcaloïdes est la présence d'un hétérocycle comportant un atome d'azote. Les alcaloïdes représentent le groupe le plus vaste de métabolites secondaires, avec une variété de structures et d'activités biologiques très importante. La classification des alcaloïdes est basée sur leur origine biosynthétique, car ces composés peuvent dériver d'acides aminés cycliques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane), ou cyclisés durant les étapes de biosynthèse (lysine ou ornithine), ou d'autre molécules cycliques comportant un atome d'azote (pipéridine, quinoline ou indole). Enfin, certains alcaloïdes, et notamment la coniine produite par la ciguë, dérivent d'un polycétide et d'ammoniaque.

2.4.1 Dérivés de l'ornithine

L'ornithine est le précurseur des pyrrolidines cycliques des solanacées et notamment du tabac, au nombre desquels on trouve la nicotine, qui possède également des propriétés insecticides (Yildiz, 2004). L'ornithine est également un précurseur de la cocaïne qui bloque la réabsorption du neurotransmetteur dopamine au niveau des nerfs sensoriels d'où son effet euphorisant.

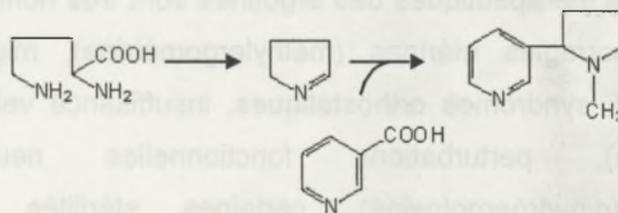


Figure 3 : Biosynthèse de la nicotine à partir d'ornithine et d'acide nicotinique

2.4.2 Dérivés de la phénylalanine ou de la tyrosine

Ce sont les benzoquinolines qui sont synthétisées par de nombreuses plantes ainsi que par des microorganismes. Au sein de cette famille, on retrouve de nombreux composés aux applications thérapeutiques, tels que l'éphédrine (utilisée initialement dans le traitement de l'asthme) et la cytochalasine (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine), qui dérivent tous deux de la phénylalanine. La famille des morphiniques, au sein de laquelle outre la morphine, on retrouve la codéine (traitement de la toux), la papavérine (myorelaxant) ou la berbérine (utilisée comme antibiotique d'usage topique), est issue de la condensation de deux molécules de tyrosine. De nombreuses recherches sont conduites sur les alcaloïdes morphiniques, notamment pour séparer leurs propriétés analgésiques de leurs propriétés narcotiques. Enfin, un des intermédiaires des voies de biosynthèse des morphiniques est la dopamine, un neurotransmetteur synthétisé par le système nerveux central et périphérique des mammifères, ce qui explique le tropisme et l'effet sur le système nerveux des morphiniques. La colchicine est synthétisée par la colchique. Elle inhibe l'agrégation des dimères de tubuline nécessaire à la formation des micro-tubules (Lee *et al.*, 1999). Cet agent antiméiotique est bien connu des biologistes cellulaires.

2.4.3 Dérivés du tryptophane ou indole alcaloïdes

Un quart environ des alcaloïdes est issu du tryptophane. De nombreux composés ont trouvé des applications thérapeutiques. Ainsi, un des composants du curare, un poison utilisé par les populations autochtones d'Amérique du sud, contient de la D-tubocurarine, une molécule utilisée en anesthésie. Une des familles appartenant aux indole-alcaloïdes les plus connues dérive de l'ergotine. Synthétisée par un champignon parasite du seigle et des céréales, *Claviceps purpurea* (ergot de seigle), cette classe a été responsable de milliers de décès en Europe au Moyen Age. L'ergotine, consommé sous forme de pain confectionné à partir de seigle contaminé, était responsable du " feu de Saint Antoine " dont ont été victimes des villages entiers. Les usages thérapeutiques des ergotines sont très nombreux (Tudzynski *et al.*, 2001) : hémorragies utérines (méthylergométrine), migraine (ergotamine, dihydroergotamine), syndromes orthostatiques, insuffisance veineuse fonctionnelle (dihydroergotamine), perturbations fonctionnelles neuropsychiques et psychomotrices (dihydroergotoxine), certaines stérilités, aménorrhées et galactorrhées (bromocriptine). Enfin, notons l'existence d'un dérivé semi synthétique

des ergotines : l'acide lysergique diéthylamine, plus connu sous le nom de LSD, un puissant hallucinogène, utilisé un temps dans les traitements de certaines schizophrénies. Un des principes actifs les plus efficaces pour le traitement des leucémies appartient également aux indole-alcaloïdes. Il s'agit de la vinblastine, un antimétabolite isolé à partir de *Catharanthus roseus*, la pervenche de Madagascar. Ce métabolite secondaire a été initialement isolé avec un autre antimétabolite capable de précipiter la tubuline, la vincristine, qui est également utilisé dans le traitement du Lymphome de Hodgking (Duflos *et al.*, 2002).

2.4.4 Dérivés de la quinoline

Isolé à l'origine de l'écorce du quinquina, *Cinchona succibura*, la quinine est le chef de file de cette famille de 31 alcaloïdes. Cette molécule qui comporte un noyau quinoline a été largement utilisée pour soigner les patients atteints de paludisme. Bien que des agents chimio-thérapeutiques synthétiques ont depuis largement supplanté la quinine, cette molécule refait son apparition dans le tableau thérapeutique des paludismes à souches multi-résistantes (Delhaes *et al.*, 2003).

2.5 Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes, comme leur nom l'indique, sont des métabolites secondaires dont la structure comporte un noyau aromatique substitué par une chaîne à trois carbones (C6=phényl, C3=propane). Ces métabolites secondaires sont quasi exclusivement spécifiques des plantes. Les fonctions physiologiques des phénylpropanoïdes sont multiples, incluant notamment les lignines, les coumarines, les stilbènes, et les flavonoïdes. Les phénylpropanoïdes du groupe des lignines représentent le second groupe après la cellulose en terme d'abondance au sein de la biosphère. Les lignines jouent un rôle majeur, tant dans l'architecture et la rigidité des plantes supérieures, que dans la protection de celles-ci contre diverses maladies. Les coumarines et les stilbènes sont impliqués dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes des plantes, notamment grâce à leur fonction d'agents antimicrobiens. Les composés de type flavonoïdes servent à la fois d'attracteur pour des insectes pollinisateurs, de protecteur de la plante aux ultraviolets ou de répulsif contre d'autres insectes. Ces molécules sont impliquées dans la transduction de signaux chez la plante ou ont des fonctions antibiotiques.

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés via la voie de l'acide shikimique qui est également un intermédiaire de la voie de biosynthèse des acides aminés naturels aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine). Enfin, tous les métabolites secondaires aromatiques ne dérivent pas nécessairement des phénylpropanoïdes : un cycle aromatique peut également être généré via la voie de biosynthèse des polycétide synthétases (cf. Figure 1). De même, des phénylpropanoïdes peuvent également être incorporés dans des polycétides. Les applications thérapeutiques des phénylpropanoïdes concernent principalement les coumarines qui sont utilisées dans le traitement des thromboses veineuses. Enfin, certains antibiotiques tels le chloramphénicol appartiennent à la famille structurale des phénylpropanoïdes.

3 Antibiotiques

3.1 Définitions et généralités

L'action bactériostatique de certains micro-organismes envers d'autres avait été observée dès 1877 par Pasteur ainsi que par Joubert (à propos du bacille charbonneux). Cependant, ce n'est qu'en 1929 que Sir Alexander Fleming constate que la culture en boîte de Petri de staphylocoques est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique, utilisable en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse permit de disposer de grandes quantités de cette substance : la pénicilline.

En dehors des moisissures du genre *Penicillium* ou *Cephalosporium*, les bactéries des genres *Streptomyces* et *Bacillus* produisent de nombreux antibiotiques. Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses à coloration Gram positive, et strictement aérobies. Le sol est leur habitat naturel où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques. Les *Streptomyces* produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. Cette abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent dans aucun autre genre bactérien (Pfeifer & Khosla, 2001).

Outre les antibiotiques, qui sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, le microbiologiste distingue un autre type d'agents anti-bactériens : les agents chimiothérapeutiques qui sont des antimicrobiens synthétisés chimiquement. Cette distinction remonte à l'avènement de l'ère moderne de la thérapeutique

antimicrobienne avec la découverte par Domagkt, en 1935, d'une famille d'agents chimiothérapeutiques à large spectre, les sulfonamides.

Antibiotiques et agents chimiothérapeutiques interfèrent avec des mécanismes cellulaires microbiens essentiels et conduisent à la stase (bactériostatiques) ou à la mort de la cellule bactérienne (bactéricides). A la frontière entre antibiotiques et agents chimiothérapeutiques se trouvent des substances hybrides : les antibiotiques semi synthétiques. Leur noyau actif, isolé d'un micro-organisme, a été chimiquement modifié de façon à en modifier les propriétés : obtention de familles d'analogues, de composés plus actifs, ou moins toxiques pour les eucaryotes, aux propriétés pharmacodynamiques optimisées, etc.. Enfin, des composés initialement isolés à partir de micro-organismes peuvent être synthétisés chimiquement. Ils sont alors appelés antibiotiques de synthèse, par opposition aux agents chimiothérapeutiques.

3.2 Modes d'action

La notion de chimiothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de substances chimiques en thérapeutique, a vu le jour en 1909 lorsque Paul Ehrlich en donne le principe de base : une substance chimiothérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le micro-organisme pathogène, mais inoffensive pour les cellules de l'organisme hôte. Ce principe implique de cibler des processus biochimiques fondamentalement différents entre procaryotes et eucaryotes. Les différents modes d'action des antibiotiques, qui ont permis la classification de ces derniers, sont présentés ci-dessous.

3.2.1 *Inhibition de la biosynthèse de la paroi*

La paroi bactérienne est composée d'un réseau réticulé composé d'un polymère complexe appelé peptidoglycane. Ce polymère, comme son nom l'indique, est composé de peptides et de sucres aminés. La fraction hydrocarbonée est un polymère d'acide N-acétyl muraminique (NAM) et de N-acétyl glucosamine (NAG) alternés. Chaque résidu NAM est substitué par un peptide composé de 4 à 5 résidus. Chaque peptide est capable d'établir des liaisons covalentes avec un peptide adjacent, soit dans le même plan que le polymère (NAM-NAG)_n, soit perpendiculairement entre deux chaînes pour aboutir à un véritable réseau formé d'une série de couches successives de glycanes réticulés appelés muropeptides.

Cette paroi est directement exposée au milieu extérieur chez les bactéries Gram positif. Elle est insérée entre la membrane plasmique et la membrane externe chez les bactéries Gram négatifs (Figure 4).

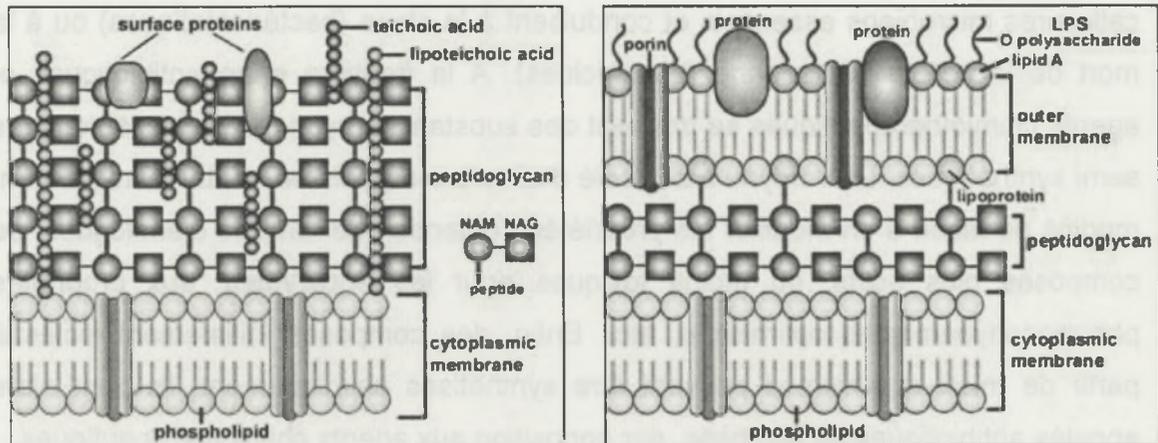


Figure 4: Comparaison des structures de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries à Gram positif (à gauche) et à Gram négatif (à droite).

Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne sont classés en trois groupes, selon leur mode d'action (Figure 5). L'inhibition peut se faire au niveau de la biosynthèse des précurseurs de la paroi (fosfomycine et cyclosérine), au niveau de l'insertion des unités glycaniques précurseurs de la paroi et de la transpeptidation (glycopeptides et β lactamines, respectivement), ou encore au niveau du transfert des précurseurs de la paroi à travers la membrane plasmique de la bactérie (bacitracine).

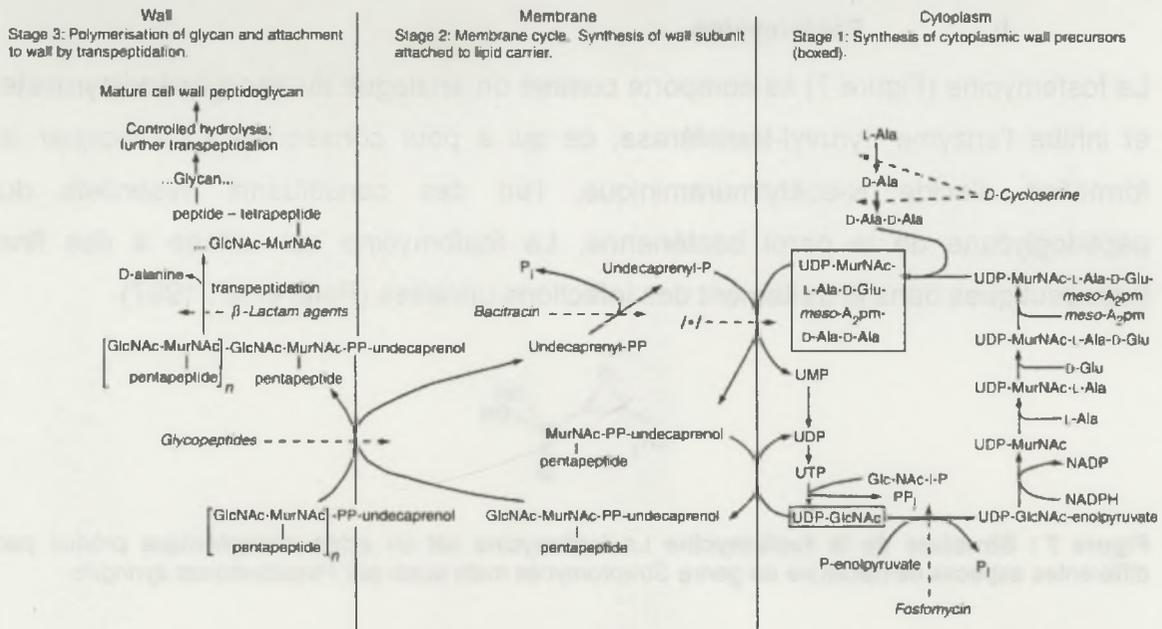


Figure 5 : Mode d'action de différents inhibiteurs de la biosynthèse du peptidoglycane (reproduit d'après Chopra *et al.*, 2002)

3.2.1.1 Inhibition de la synthèse de précurseurs de la paroi

a Cyclosérine

La cyclosérine inhibe les étapes précoces de la biosynthèse du mucopeptide. Isolée à l'origine de *Streptomyces orchidaceus*, cet analogue structural de la D-alanine (Figure 6) inhibe de manière compétitive l'alanine racémase qui est l'enzyme permettant la conversion de L-alanine en D-alanine (Lambert *et al.*, 1972). La D-cyclosérine inhibe également la D-alanyl-D-alanine synthétase empêchant la formation du di-peptide D-ala-D-ala nécessaire à la réticulation du peptidoglycane.

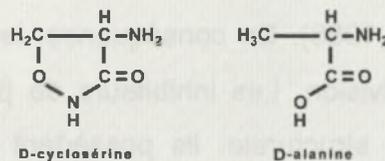


Figure 6 : Analogie structurale entre la cyclosérine et la D-alanine : L'analogie structurale permet de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition compétitive des enzymes de biosynthèse du mucopeptide prenant en charge la D-alanine.

b Fosfomycine

La fosfomycine (Figure 7) se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase, ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne. La fosfomycine est utilisée à des fins thérapeutiques dans le traitement des infections urinaires (Patel *et al.*, 1997).

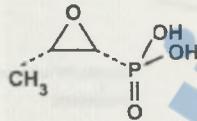


Figure 7 : Structure de la fosfomycine La fosfomycine est un acide phosphonique produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae*.

3.2.1.2 Inhibition de l'insertion des unités glycaniques, précurseurs de la paroi, et de la transpeptidation

a β -Lactames

Les antibiotiques de cette classe exercent leur effet via l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane formant la paroi bactérienne. Ils partagent une structure commune, le noyau β -lactame, une amine cyclique à quatre atomes qui est (ou non) substituée par un cycle. On distingue cinq classes de β -Lactames en fonction du cycle adjacent (Figure 8). Le noyau β -Lactame mime la structure du dipeptide D-Ala-D-Ala servant à la réticulation entre deux chaînes peptidiques parallèles du muropeptide. Il se fixe spécifiquement à la carboxypeptidase ou à la transpeptidase responsable de la réticulation du peptidoglycane. La biosynthèse de ce dernier est alors bloquée, ce qui empêche la division cellulaire et aboutit à l'éclatement de la bactérie (Spratt & Cromie, 1988). En conséquence, les β -Lactames ne sont actifs que sur des cellules en division. Les inhibiteurs de β -Lactamase sont également classés dans cette famille structurale. Ils possèdent une activité antibactérienne intrinsèque faible mais ce sont de puissants substrats-suicide se liant de manière irréversible à la β -lactamase (une enzyme capable de détoxifier le noyau β -lactame), empêchant son action ultérieure sur les β -lactames (Walsh, 2000).

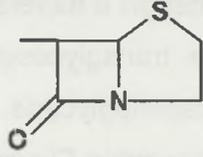
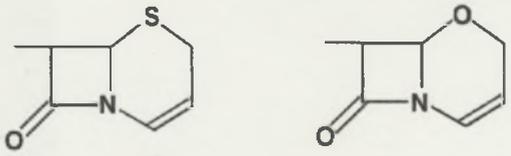
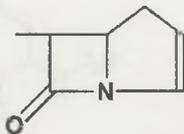
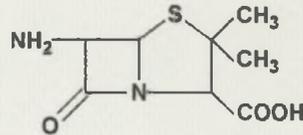
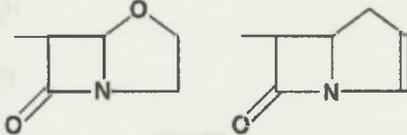
Famille	Noyau	Structure commune
Pénicillines	Cycle péname	
Céphalosporines	Cycle cephème et oxycephème	
Carbapénèmes	Cycle carbapénème	
Monobactames	Cycle lactame	
Inhibiteurs de β -Lactamases	Cycle clavame	

Figure 8 : Structure des différentes familles de β Lactames

La plupart des β -Lactames sont des dérivés semi synthétiques pour lesquels le noyau β -lactame a été substitué afin d'élargir la famille d'antibiotiques et de disposer de variants structuraux aux propriétés modifiées (notamment des composés résistants aux β -Lactamases, ainsi que des composés pharmaco-disponibles par voie orale).

b Glycopeptides

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres (mannose et glucosamine dans la teicoplanine; glucose et vancosamine dans la vancomycine). L'inhibition de la synthèse du peptidoglycane bactérien par les glycopeptides comme la vancomycine (Figure 9) est effectuée par fixation du glycopeptide au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques de la paroi bactérienne. Cette

fixation a lieu lorsque ces extrémités émergent de la membrane cytoplasmique, durant leur transport à travers celle-ci (Williams DH, 1996). Elle conduit à un blocage des étapes de transglycosylation et de transpeptidation nécessaires à la bonne synthèse du peptidoglycane. La vancomycine est le premier glycopeptide isolé, sa structure est présentée Figure 9.

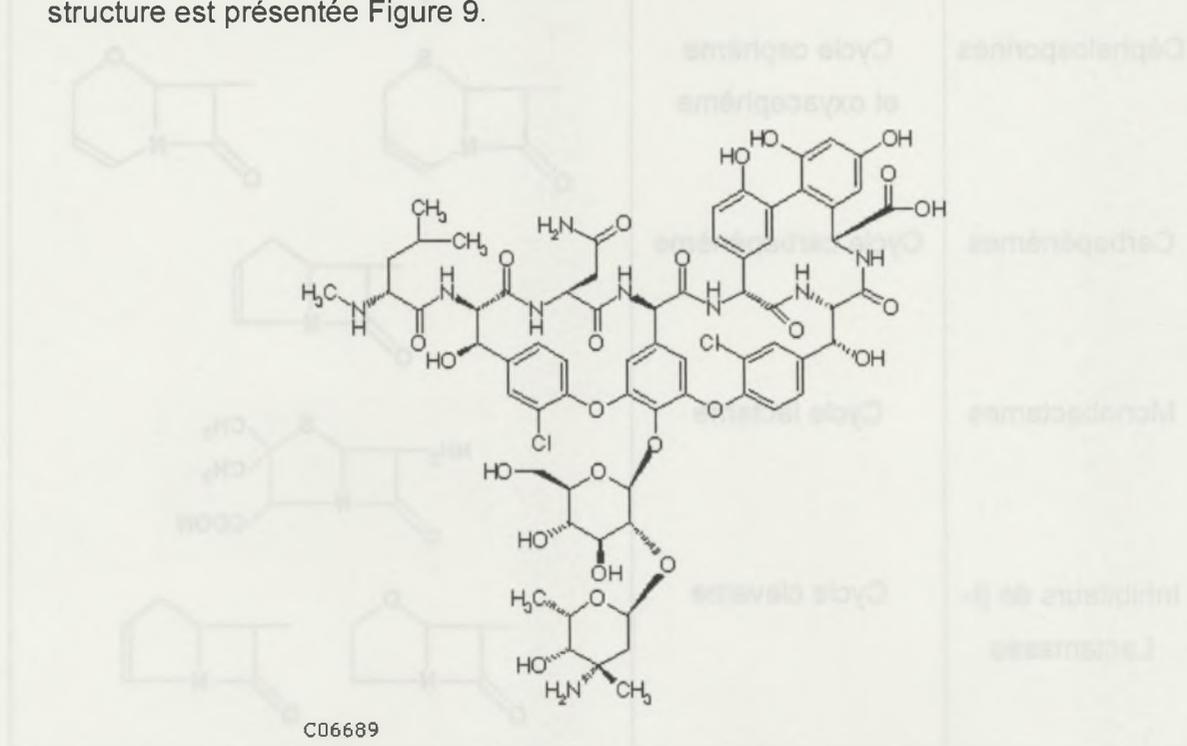


Figure 9 : Structure de la vancomycine. La vancomycine est le premier glycopeptide à avoir été isolé, en 1956 à partir d'échantillon de sols contenant le germe *Streptomyces orientalis* (*Nocardia orientalis*) prélevés en Inde et en Indonésie.

3.2.1.3 Inhibition du transfert des précurseurs de la paroi sur un lipide porteur, assurant leur transport à travers la membrane plasmique : la bacitracine

La bacitracine (Figure 10) est un complexe d'antibiotiques peptidiques produits par *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. Son mode d'action est le blocage de la dissociation du complexe muropeptide – transporteur lipidique chargé de l'export du muropeptide à la surface externe de la membrane bactérienne (Konz *et al.*, 1997).

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



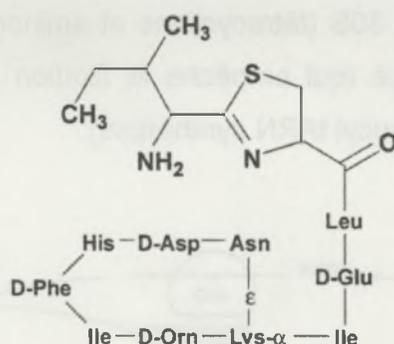


Figure 10 : Structure de la bacitracine

3.2.1.4 Interférence avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique : polymixine et colistine

La polymixine et la colistine sont des antibiotiques peptidiques cycliques isolés à partir de *Bacillus polymixa* ou *B. colistinus*, respectivement. Ils interviennent non pas au niveau de la paroi bactérienne mais au niveau de la membrane plasmique. Ils agissent comme des détergents cationiques grâce à leur caractère amphipatique et interfèrent ainsi avec les phospholipides membranaires, ce qui déstabilise la membrane bactérienne et aboutit à une activité cytotoxique (Schindler & Teuber, 1975). Ce sont les seuls représentants d'antibiotiques interférant avec les membranes plasmiques. Néanmoins, ces molécules sont peu utilisées en thérapie clinique à cause de leur faible niveau de spécificité. En effet, le faible degré de variation des phospholipides membranaires entre eucaryotes et procaryotes rend ces composés trop peu spécifiques.

3.2.2 *Inhibition de la synthèse protéique*

De nombreux antibiotiques ciblent la synthèse protéique. Ils agissent au niveau d'une des trois étapes principales de la traduction (initiation, élongation ou terminaison). Leur mode d'action se situe toujours au niveau du ribosome, et jamais au niveau de l'activation de l'acide aminé incorporé (Figure 11). Ces antibiotiques ont une affinité pour le ribosome procaryote 70S (par opposition au 80S eucaryote, d'où une toxicité spécifique). Celui-ci est composé de la grosse sous-unité 50S, elle même composée des ARN ribosomaux 5S et 23S, ainsi que de la petite sous unité 30S qui intègre l'ARNr 16S. On s'intéressera successivement aux inhibiteurs de la sous - unité 50S (macrolides, lincosamines, streptogrammines, phénicolidés et oxazolidines), aux

inhibiteurs de la sous unité 30S (tétracyclines et aminoglycosides), ainsi qu'à deux exceptions : l'acide fusidique (qui empêche la fixation de l' aminoacyl tARN) et la mupirocine (qui inhibe l' isoleucyl tARN synthétase).

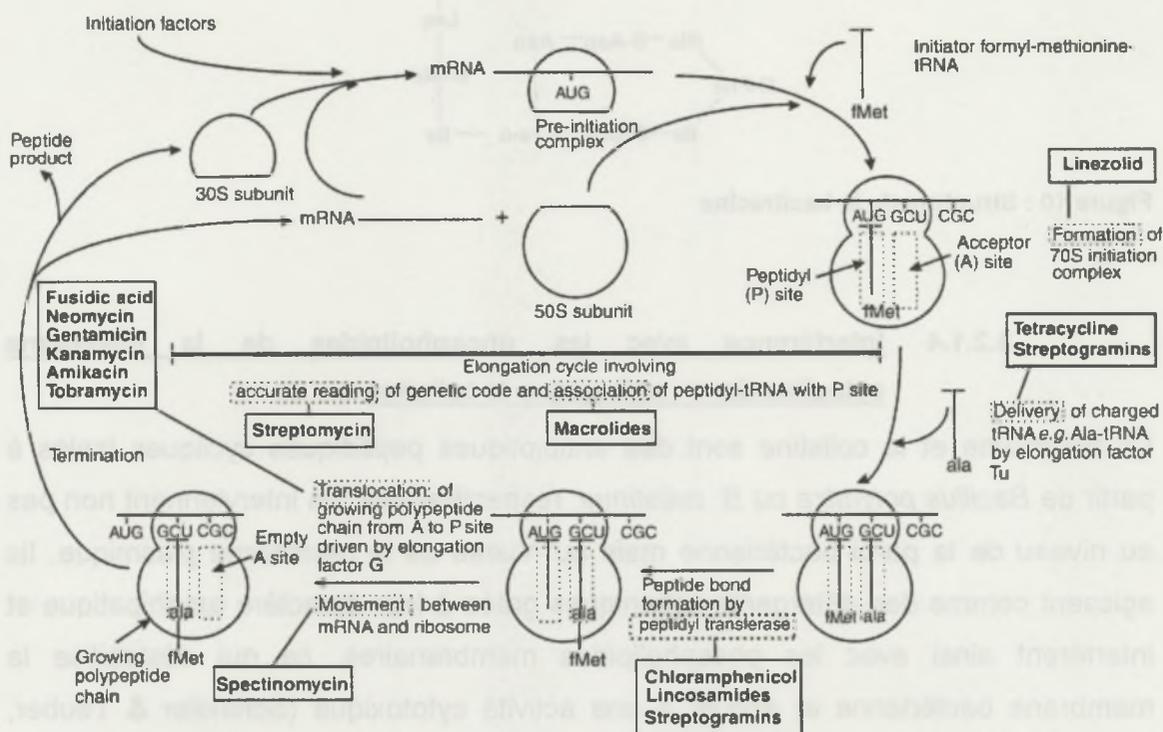


Figure 11 : Mode d'action de différents inhibiteurs de la synthèse protéique (reproduit d'après Chopra et al., 2002)

3.2.2.1 Inhibiteurs spécifiques de la sous unité ribosomale 50S

a Macrolides et cétilides

Les macrolides sont constitués par un macrocycle à 14, 15 ou 16 carbones, porteur d'une fonction lactone sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé. En raison de la présence d'une et parfois de deux amines, les macrolides sont des molécules basiques. Le chef de file des macrolides est l'érythromycine (Figure 12) isolée aux Philippines de *Streptomyces erythreus*. Les macrolides sont synthétisés par des mégasynthèses de type PKS (Rawlings, 2001- voir également Chapitre II 1.2).

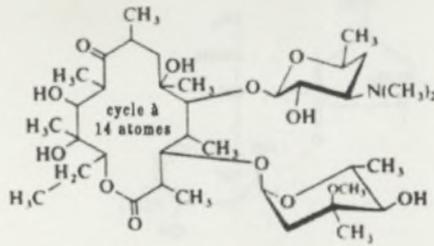


Figure 12 : Structure de l'érythromycine A

Le mécanisme d'action des macrolides consiste en une inhibition de la synthèse protéique par fixation à la sous unité ribosomale 50S au niveau du site P. Cette fixation inhibe à la fois la translocation depuis le site P vers le site A et l'élongation de la protéine en cours de synthèse par la peptidyl transférase (Brisson-Noel *et al.*, 1988) . Les macrolides sont bactériostatiques sur la plupart des bactéries, exception faite de certaines bactéries Gram positifs pour lesquelles elles sont bactéricides.

Les cétolides (3-kéto-macrolides) constituent une classe de composés antibiotiques dérivés des macrolides. Les cétolides sont des dérivés semi-synthétiques de seconde génération de l'érythromycine (macrocycle à 14 atomes), qui ont un substituant 3-kéto à la place du sucre de type L-cladinose. Les cétolides comportent en outre un groupement méthyl en 6-O, tout comme la clarithromycine (ou 6-méthoxy-érythromycine).

b Lincosamines

Les lincosamides sont représentées à l'heure actuelle par deux molécules : la lincomycine et son dérivé semi-synthétique la clindamycine. La lincomycine (Figure 13) a été purifiée à partir d'un actinomycète (*Streptomyces lincolnensis*), provenant d'un échantillon de sol prélevé dans la région de Lincoln, au Nebraska (USA). Ces antibiotiques agissent comme les macrolides en se fixant sur la sous-unité 50S des ribosomes, inhibant ainsi l'étape de transpeptidation (Lai *et al.*, 1973). Ce sont des antagonistes des macrolides.

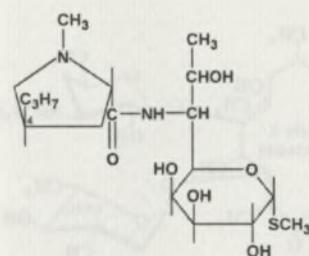


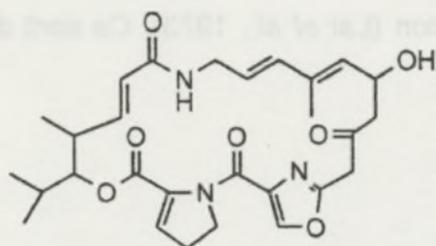
Figure 13 : Structure de la lincosamine

c Synergistines

Les synergistines sont des métabolites secondaires à activité antibiotique produits par certaines espèces de *Streptomyces* (*S. graminofaciens*, *S. pristinaespiralis* ou encore *S. virginiae*). Ces composés sont répartis en deux grandes classes : le groupe A regroupe des macrolactones, de masse moléculaire environ 500. (exemples : streptogramine A, pristinamycine II et virginiamycine M, Figure 14A) et le groupe B regroupe des peptides cycliques, de masse moléculaire environ 800. (exemples : streptogramine B, pristinamycine I et virginiamycine S, Figure 14B). Une synergistine du groupe A associée à une synergistine du groupe B agissent de manière synergique. Lorsqu'on les associe, on obtient une activité antibiotique plusieurs fois supérieure à celle des composants seuls, d'où leur nom générique. Les synergistines présentent en outre une synergie avec les aminoglycosides et la rifampicine.

Les synergistines agissent sur la sous-unité 50 S du ribosome bactérien et interfèrent par deux mécanismes distincts avec le métabolisme de l'ARN. Elles empêchent la traduction de l'ARNm en s'opposant à l'incorporation de l'ARNt au niveau des ribosomes (Aumercier *et al.*, 1992).

A



B

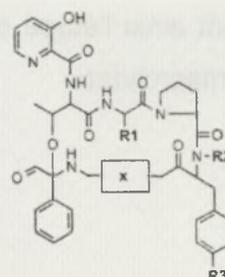


Figure 14 : Structure des noyaux de synergistines du groupe A (à gauche) et du groupe B (à droite)

d Phénicolidés : chloramphénicol et thiamphénicol

Antibiotique bactériostatique inhibiteur de la synthèse protéique par inhibition de la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc de la réaction de transpeptidation par la peptidyl transférase, le chloramphénicol (Figure 15) est un métabolite secondaire découvert chez *Streptomyces* (Schwarz *et al.*, 2004). La production de chloramphénicol est à l'heure actuelle réalisée par synthèse chimique. Exclusivement spécifique du ribosome 50S, son utilisation clinique est à l'heure actuelle limitée aux infections graves (type typhoïde) à cause d'excès ayant causé par le passé des morts par anémie, vraisemblablement pour cause de toxicité envers les ribosomes 50S mitochondriaux de cellules à fort taux de multiplication, telles que les cellule hématopoïétiques.

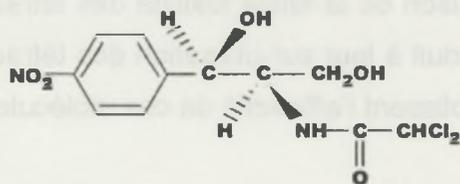


Figure 15 : Structure du chloramphénicol

e Oxazolidinones

La classe des oxazolidinones (décrite pour la première fois en 1987, Slee *et al.*, 1987) est la première nouvelle classe d'antibiotiques apparue au cours de ces 30 dernières années (Stevens *et al.*, 2004). Les composés de ce type agissent en inhibant la synthèse protéique en empêchant la formation du complexe d'initiation 70S de la traduction [formé de la sous-unité 50 S, de la sous-unité 30 S et de l'ARNm, et enfin de l'ARN de transfert Met (Kloss *et al.* 1999)].

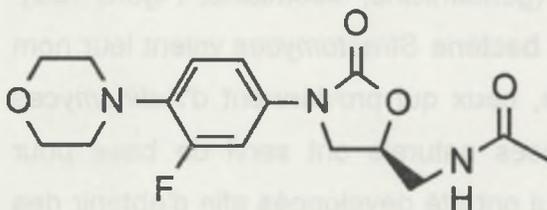


Figure 16 : Structure du linezolid, la seule oxazolidinone utilisée en clinique.

3.2.2.2 Inhibiteurs spécifiques de la sous-unité ribosomale 30S

a **Tétracyclines**

Cette famille de molécules composées de quatre cycles (Figure 17) est aussi synthétisée par des actinomycètes du genre *Streptomyces*. Le mode d'action des tétracyclines est le blocage de la translocation du ribosome par blocage de l'aminocyl tARN sur le site A au niveau de la sous-unité 30S du ribosome. Ce blocage a également lieu au niveau de la sous-unité ribosomale 80S (ribosomes eucaryotes), mais comme des bactéries possèdent un système de transport actif conduisant à l'accumulation des tétracyclines au niveau intracellulaire, les doses bactéricides sont beaucoup plus faibles que les doses toxiques pour les eucaryotes. Cette caractéristique permet une utilisation thérapeutique fréquente de cette famille d'antibiotiques (Chopra, 1985). La combinaison de la faible toxicité des tétracyclines associée à leur large spectre d'hôtes a conduit à leur sur-utilisation des tétracyclines et à l'établissement de résistances qui affaiblissent l'efficacité de ces molécules.

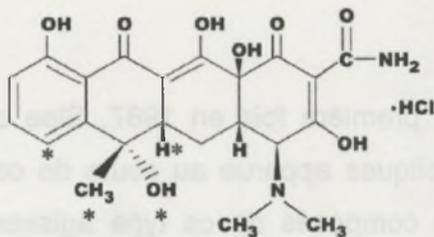


Figure 17 : Structure de l'hydrochlorure de tétracycline

Les quatre cycles caractéristiques des tétracyclines sont synthétisés par une polycétide synthétase.

b **Aminoglycosides**

Les premiers aminoglycosides découverts étaient des molécules naturelles produites par des souches de *Streptomyces* (streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine, Figure 18A) ou d'*Actinomyces* (gentamicine, sisomicine, Figure 18B). On notera que les antibiotiques dérivés de la bactérie *Streptomyces* voient leur nom s'écrire avec un "y" : -mycine. En revanche, ceux qui proviennent d'*Actinomyces* s'écrivent avec un "i" : -micine. Ces composés naturels ont servi de base pour l'élaboration de produits semi-synthétiques qui ont été développés afin d'obtenir des molécules insensibles à l'inactivation par les bactéries devenues résistantes aux aminoglycosides naturels. Ces composés se sont aussi avérés moins toxiques que les composés de base.

Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques qui exercent leur effet toxique par inhibition de l'initiation de la synthèse protéique par la fixation

aux ribosomes bactériens (Fourmy *et al.*, 1996). La streptomycine se fixe sur la protéine S12 de la sous-unité 30S du ribosome impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique. Elle bloque à la fois la fixation du tARN Met initiateur et la dissociation du ribosome. Ce mécanisme ne permet cependant pas d'expliquer l'effet bactéricide de la streptomycine. La kanamycine se fixe sur la sous-unité ribosomale 30S empêchant ainsi sa fixation à la sous unité 50S. Il en résulte une accumulation de sous-unité 30S toxique pour la cellule bactérienne (Greenwood & Whitley, 2002).

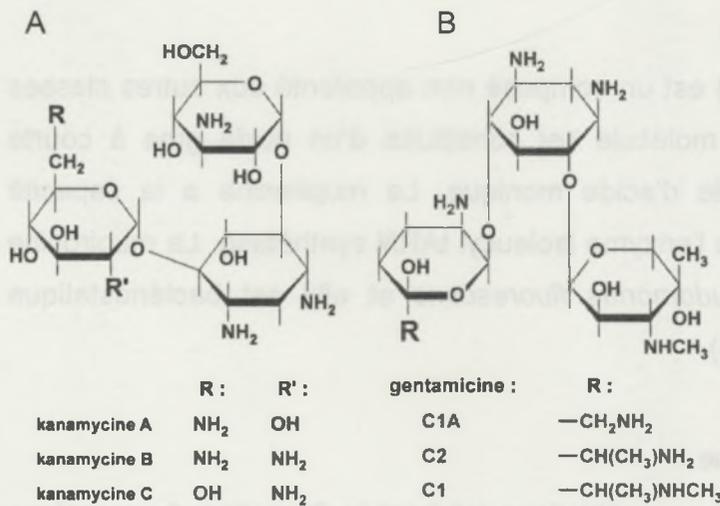


Figure 18 : Structure de différents aminoglycosides

A. Structure de la kanamycine : Il s'agit en fait d'un complexe d'antibiotiques (kanamycines A, B et C) isolé de la bactérie *Streptomyces kanamyceticus*. La kanamycine A (usuellement appelée kanamycine) est le principal constituant du complexe.

B. Structure de la gentamicine. Le composé commercial appelé gentamicine est en fait un mélange de trois composants de la gentamicine C (gentamicines C1, C1a, C2) en proportion d'environ 30%, 30% et 40% respectivement.

3.2.2.3 Autres inhibiteurs de la synthèse protéique

a Acide fusidique

L'acide fusidique (Figure 19-gauche) s'avère bactériostatique à faibles doses et bactéricide à des doses plus élevées. Cet antibiotique agit en inhibant la synthèse protéique, en se fixant au facteur EF-G d'élongation de la traduction et empêchant ainsi la fixation des amino-acyl-tARN (Turnidge & Collignon, 1999). L'acide fusidique est un métabolite secondaire de type stéroïde issu de la fermentation du champignon *Fusidium coccineum*. Il est également isolé à partir d'autres champignons (*Mucor ramannianus* et *Isaria kogan*).

Acide fusidique

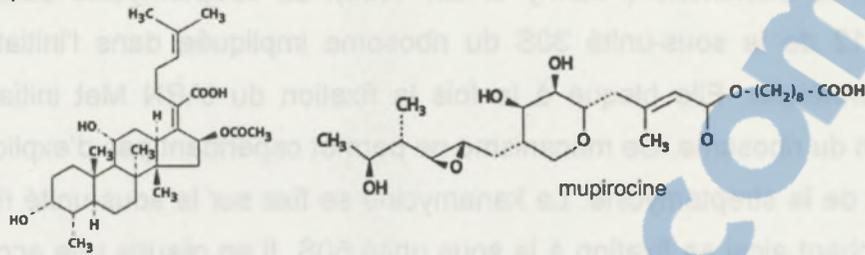


Figure 19 : Structure de l'acide fusidique et de la mupirocine

b Mupirocine

La mupirocine (Figure 19-droite) est un composé non apparenté aux autres classes connues d'antibiotiques. Cette molécule est constituée d'un acide gras à courte chaîne greffé sur une molécule d'acide monique. La mupirocine a la capacité d'inhiber de manière compétitive l'enzyme isoleucyl tARN synthétase. La mupirocine a été isolée à partir de *Pseudomonas fluorescens* et elle est bactériostatique (Yanagisawa & Kawakami, 2003).

c Pulvomycine

La pulvomycine (Figure 20) est un antibiotique inhibant la formation du complexe ternaire aminoacyl - tARN - GTP - facteur EF-Tu. La fixation de la pulvomycine sur EF-Tu altère l'affinité de ce facteur d'élongation de la traduction pour le GTP, ce qui a pour effet de bloquer la fixation du complexe Amino-acide - tARN sur le ribosome (Wolf *et al.*, 1978).

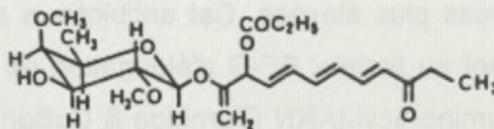


Figure 20 : Structure de la pulvomycine

3.2.3 Interférence avec le métabolisme des acides nucléiques

La plupart des antibiotiques et des chimiothérapeutiques qui ciblent les acides nucléiques sont peu ou pas sélectifs car ils ne font pas la différence entre acides nucléiques procaryotes et eucaryotes. Les seules familles ayant une sélectivité pour

les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN procaryotique sont les quinolones et les rifamycines.

3.2.3.1 Quinolones et fluoroquinolones

L'acide nalidixique (Figure 21) est le chef de file des quinolones dont le mode d'action est la fixation à l'ADN gyrase bactérienne. Cette enzyme est responsable du relâchement des surenroulements de la double hélice causés par la réplication, la transcription ou la réparation de l'ADN (Shen, 1993). La sélectivité des quinolones est liée au fait qu'il n'existe pas de pendant de cette enzyme chez les eucaryotes. Les microcines, dont la microcine B17 synthétisée par *E. coli* ciblent également les ADN gyrases (Li *et al.*, 1996). Les quinolones sont sans effet sur les bactéries Gram positives (Greenwood & Whitley, 2002).



acide nalidixique

Figure 21 : Structure de l'acide nalidixique

3.2.3.2 Ansamycines et rifamycines

Il s'agit encore d'une famille de polycétides synthétisés par le genre *Streptomyces*. Le mode d'action des rifamycines est l'inhibition de la transcription par blocage spécifique de l'entrée du premier nucléotide au niveau de l'ARN polymérase bactérienne. Il en résulte une absence d'activation de l'enzyme et une inhibition de la biosynthèse de l'ARN messager. Outre ses propriétés antibiotiques, la geldanamycine, une ansamycine, est également utilisée en chimiothérapie du cancer car elle est affine pour Hsp90, une chaperonne eucaryote stabilisant de nombreux oncogènes (Neckers *et al.*, 1999, voir également chapitre III).

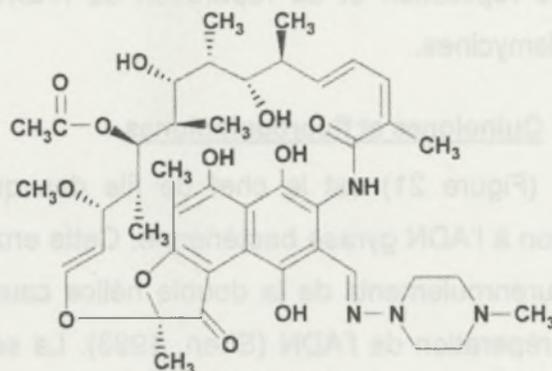


Figure 22 : Structure de la rifampicine

3.2.4 Antimétabolites

Cette famille de molécules de faible poids moléculaire est en fait constituée d'agents chimiothérapeutiques et non d'antibiotiques. Leur mode d'action est l'inhibition compétitive de processus cellulaires essentiels. Leur structure est proche de composés essentiels à la survie de la bactérie. Ces molécules se fixent à leur effecteur, généralement des métabolites essentiels ou bien des facteurs de croissance, les empêchant ainsi de remplir leur fonction auprès de leur substrat normal.

3.2.4.1 Sulfonamides et analogues de l'acide folique

Le para-amino-benzoate est un métabolite essentiel qui est converti en plusieurs étapes en tétrahydrofolate (THF, la forme vitaminique de l'acide folique qui est essentielle aux réactions d'échange d'un atome de carbone) par les bactéries. Le THF est lui-même requis dans la biosynthèse des purines ainsi que dans la biosynthèse de la méthionine et de la glycine. Les mammifères sont incapables de métaboliser le para-amino-benzoate pour le convertir en THF, qui doit par conséquent provenir de l'alimentation. Le métabolisme de l'acide folique constitue par conséquent une cible de choix pour des inhibiteurs compétitifs (Greenwood & Whitley, 2002).

Les sulfonamides, ainsi que l'acide para-amino-salicylique miment la structure du para-amino-benzoate et bloquent la première enzyme du métabolisme du THF. De façon similaire, la structure du triméthoprime est très proche de celle du dihydrofolate (Figure 23). Le triméthoprime bloque la seconde étape du métabolisme du THF par



inhibition compétitive de la dihydrofolate réductase. Ces inhibiteurs compétitifs aboutissent à un blocage à la fois de la synthèse protéique et de la biosynthèse des acides nucléiques.

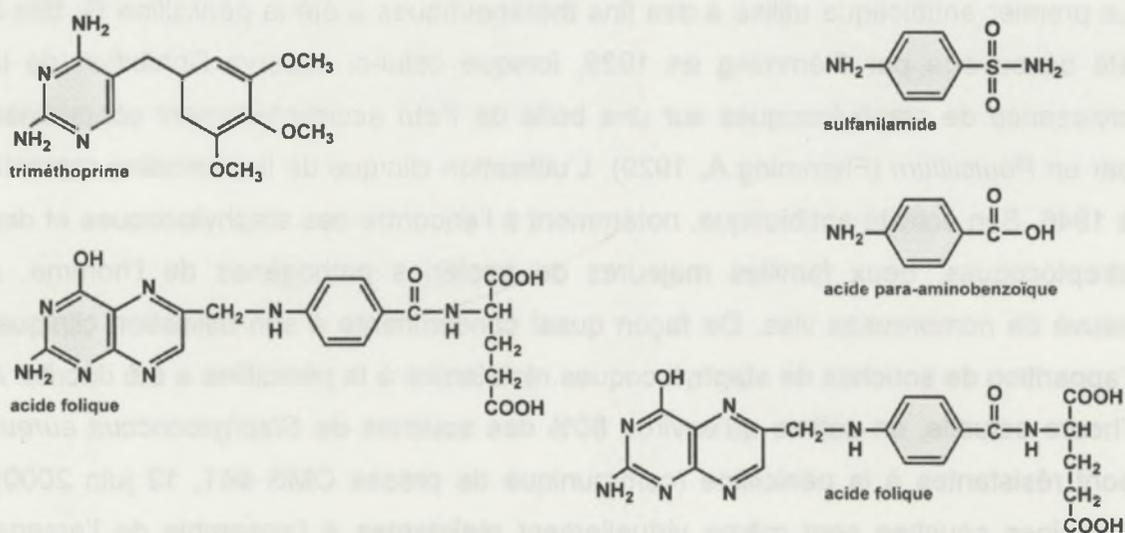


Figure 23 : Comparaison de la structure de l'acide folique avec celle d'inhibiteurs du métabolisme THF

3.2.4.2 Ethambutol et isoniazide

Ces composés sont des inhibiteurs compétitifs utilisés conjointement aux antibiotiques (originellement la streptomycine puis à l'heure actuelle la rifampicine) dans le traitement de la tuberculose, une affection respiratoire causée par une mycobactérie, le bacille de Koch. L'éthambutol et l'isoniazide inhibent l'incorporation de l'acide mycolique dans la paroi des mycobactéries (Takayama *et al.*, 1979). D'autre part, la structure de l'isoniazide est proche de celle de la pyridoxine (ou vitamine B6) et cet agent chimiothérapeutique pourrait donc également inhiber les réactions enzymatiques requérant cette vitamine. Enfin, une peroxydase mycobactérienne serait capable d'activer l'isoniazide en un composé toxique pour diverses cibles cellulaires.

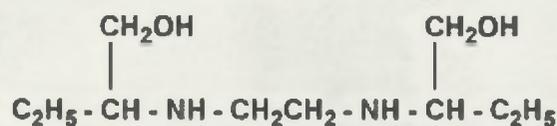


Figure 24 : Structure de l'éthambutol

3.3 Le problème des résistances

3.3.1 *Un souci majeur de santé publique*

Le premier antibiotique utilisé à des fins thérapeutiques a été la pénicilline G. Elle a été découverte par Flemming en 1929, lorsque celui-ci observa l'inhibition de la croissance de staphylocoques sur une boîte de Petri accidentellement contaminée par un *Penicillium* (Flemming A, 1929). L'utilisation clinique de la pénicilline remonte à 1946. Son activité antibiotique, notamment à l'encontre des staphylocoques et des streptocoques, deux familles majeures de bactéries pathogènes de l'homme, a sauvé de nombreuses vies. De façon quasi concomitante à son utilisation clinique, l'apparition de souches de staphylocoques résistantes à la pénicilline a été décrite. A l'heure actuelle, on estime qu'environ 80% des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la pénicilline (communiqué de presse OMS #41, 12 juin 2000). Certaines souches sont même virtuellement résistantes à l'ensemble de l'arsenal thérapeutique disponible. La fin des années 1940 et le début des années 1950 ont vu la découverte de la streptomycine, de la tétracycline et du chloramphénicol; ces nouveaux antibiotiques ont permis de constituer un arsenal thérapeutique efficace contre l'ensemble des bactéries pathogènes de l'homme : bactéries Gram positif et négatif, certains parasites intracellulaires et surtout le bacille de Koch, agent de la tuberculose. Malheureusement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a simultanément conduit à l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes. A titre d'exemple, le Japon a été dans les années cinquante, le théâtre d'épidémies récurrentes de dysenterie. Ces épidémies ont été corrélés à l'augmentation de la fréquence d'isolement de souches multi-résistantes de *Shigella*, agent causal de cette pathologie (Watanabe T, 1963). Les souches isolées étaient résistantes au chloramphénicol, à la tétracycline, à la streptomycine et aux sulfonamides. Par ailleurs, il a été démontré qu'un transfert de ces caractères de résistance d'un isolat à un autre, voire d'une espèce à une autre, était possible.

3.3.2 Bases moléculaires de la résistance

La résistance aux antibiotiques peut être envisagée de deux manières, selon que la résistance est innée ou acquise.

3.3.2.1 Résistance innée

La résistance à un antibiotique peut être trouvée de façon naturelle chez certaines bactéries. Les mécanismes de résistance sont de différents types : une bactérie peut être résistante parce que l'antibiotique est incapable de pénétrer dans le cytoplasme bactérien et reste confiné dans le milieu externe ou il ne pourra pas exercer son activité toxique. C'est le cas des bactéries Gram négatif dont la membrane externe exerce un rôle de barrière imperméable qui protège ces bactéries d'un grand nombre de molécules (par exemple, les bactéries Gram négatif sont résistantes aux polymyxines qui, rappelons le, agissent comme des détergents). A l'instar, une bactérie peut être dépourvue du système de transport pour un antibiotique donné. Il est également possible que la molécule cible ou que la réaction biochimique ciblée par l'antibiotique soit absente ou non vitale pour la bactérie (certaines bactéries sont ainsi capables d'utiliser le folate présent dans leur environnement et sont par conséquent résistantes aux sulfonamides). Enfin, il est important de noter ici que chaque souche productrice d'un antibiotique (ex. *Streptomyces* spp.) possède le ou les gènes de résistance contre l'antibiotique qu'elle produit

3.3.2.2 Résistance acquise

C'est le type de résistance qui cause le plus gros souci en terme de santé publique et de développement de souches de bactéries pathogènes multi-résistantes. Deux types de mécanismes d'évolution sont mis en jeu dans la résistance acquise aux antibiotiques : 1) l'évolution verticale où des mutations ponctuelles apparaissent et sont sélectionnées positivement lorsqu'elles apportent un caractère positif et 2) l'évolution horizontale qui correspond à l'échange d'information génétique entre deux isolats ou deux espèces de bactéries.

L'évolution verticale est un procédé strictement darwinien de sélection naturelle d'individus ayant acquis un caractère compétitif avantageux : une mutation chromosomale spontanée confère à un individu une résistance à un antibiotique. Dans l'environnement sélectif contenant l'antibiotique, seul l'individu muté prolifère. L'évolution horizontale correspond à l'acquisition d'un gène de résistance originaire

d'un autre organisme. Par exemple, un gène de résistance de *Streptomyces* à la streptomycine (résistance innée) peut se retrouver chez *E. coli* ou chez *Shigella* (Chinault *et al.*, 1986). Ce phénomène de transfert horizontal est accentué du fait que de nombreux gènes de résistance sont localisés sur des plasmides et qu'ils peuvent donc être facilement transférés d'une espèce à une autre (Tran *et al.*, 2005)

3.3.3 Mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistances sont très variés. Un gène de résistance peut commander la synthèse d'enzyme de dégradation de l'antibiotique ; c'est le cas des β -Lactamases et des céphalosporinases qui détoxiquent les pénicillines ou les céphalosporines en hydrolysant le noyau β -lactame (Bush *et al.*, 1995). Plus de 200 types de β -lactamases sont connues à ce jour (Davies, 1994). D'autres gènes de résistance commandent la synthèse d'enzymes de modification et d'inactivation de l'antibiotique qui perd alors son affinité pour sa cible. Il existe plus de 20 enzymes capables de modifier les aminoglycosides. Ces enzymes greffent des résidus (phosphoryl ou acétyl) au squelette aminoglycosyl, conduisant ainsi à un import réduit de l'antibiotique mais surtout à une affinité moindre pour sa cible thérapeutique (Shaw *et al.*, 1993). De manière similaire, des acyltransférases et des estérases sont capables de détoxiquer le chloramphénicol et les macrolides, respectivement (Davies, 1994). D'autres bactéries modifient l'enzyme ciblée par l'antibiotique. Il en résulte une baisse de l'affinité de celle-ci pour sa cible. Ainsi, une ADN-gyrase modifiée sera moins sensible à l'action des quinolones (Walsh, 2000). De même une modification de l'ARN polymérase confère une résistance aux rifamycines. Une autre stratégie consiste en la synthèse ou la modification d'une pompe d'efflux au niveau de la membrane plasmique dont le rôle est l'élimination de l'antibiotique du milieu intracellulaire (Levy, 1992). Ce mécanisme conduit notamment à la résistance aux tétracyclines. Certaines bactéries sont capables de méthyliser l'ARN de leurs ribosomes (Bussiere *et al.*, 1998), en conséquence, l'affinité de ceux-ci pour l'antibiotique est fortement diminuée (par exemple : érythromycine) ce qui leur confère un caractère de résistance. Enfin, d'autres bactéries sont capables de modifier la structure de leur peptidoglycane et elles résistent ainsi aux cyclosérines ou aux glycopeptides tels que la vancomycine (Bugg *et al.*, 1991). L'effet de cette dernière est annulé par l'incorporation de D-ala D-hydroxybutyrate en lieu et place de D-ala-D-ala au niveau du mucopeptide (Gin & Zhanel, 1996).

3.3.4 Un besoin de nouvelles molécules

La quasi totalité de l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections bactériennes a été découvert durant " l'âge d'or " des antibiotiques, entre les années 1940 et 1960. Le développement des molécules et des analogues découverts à cette époque a considérablement réduit l'impact des infections bactériennes. Hélas l'optimisme n'est plus de mise au vu de l'émergence d'un nombre croissant de souches résistantes et multi-résistantes. Une approche pour lutter contre l'émergence des résistance a été la synthèse d'analogues des molécules d'ores et déjà existantes. Ces analogues sont insensibles aux enzymes de détoxification, ne sont pas reconnus par les pompes d'efflux spécifiques du composé original, ou bien encore sont spécifiques des mutants de la cible originale de l'antibiotique (Chopra *et al.*, 2002). Hélas, nombre de ces analogues ont eu des applications thérapeutiques de courte durée à cause de l'émergence rapide de nouvelles souches bactériennes présentant des variations par rapport aux mécanismes de résistance originaux. En d'autres termes l'adaptation de la résistance aux analogues a été rapide car il suffisait de modifier légèrement un mécanisme de résistance pré-existant.

En conséquence, il est capital d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques originales et de découvrir de nouvelles molécules aux propriétés antibiotiques. En effet, l'obtention de molécules originales avec un mode d'action différent devrait considérablement réduire les chances de voir apparaître des résistances croisées avec les mécanismes existants de résistance aux antibiotiques. Les approches basées sur la connaissance des génomes des bactéries pathogènes, quoique prometteuses, impliquent un investissement très lourd. Une autre stratégie basée sur la caractérisation de métabolites secondaires aux propriétés antibiotiques semblerait par conséquent une alternative intéressante. Dans ce cadre, un certain nombre de phytotoxines bactériennes pourraient venir enrichir un nouvel arsenal thérapeutique.

4 Phytotoxines

4.1 Definitions et généralités

Les phytotoxines sont des métabolites secondaires produits par les agents pathogènes des plantes. Elles ont donc un impact sur le développement des symptômes et de la maladie chez la plante. En revanche, seul un petit nombre d'entre eux jouent un rôle prépondérant dans l'établissement de la niche écologique

du micro-organisme qui les produit. Le phytopathologiste définit donc une phytotoxine comme un métabolite secondaire répondant à un certain nombre de critères : i) absence de virulence ou virulence très réduite chez les souches de l'agent pathogène non productrices de toxine, ii) existence d'une corrélation entre la quantité de toxine produite et la sévérité de la pathogénie, iii) production de la phytotoxine durant la phase de croissance de l'agent pathogène *in planta*, iv) possibilité de reproduire expérimentalement les symptômes *in planta* avec la phytotoxine purifiée. Les phytotoxines induisent le développement de la plupart des symptômes classiques (chlorose, nécrose, croissance anormale, flétrissement) causés par les organismes phytopathogènes qui les produisent. Elles sont par conséquent considérées comme des facteurs de virulence, mais généralement sans spécificité d'hôte. Cette définition comporte cependant un biais, puisque certains métabolites secondaires dont le mode d'action impliquerait une modification d'une voie biochimique de l'hôte, et dont l'effet délétère pour la plante ne se manifesterait qu'au niveau biochimique (et non au niveau macroscopique par la production de symptômes), y échappent.

4.2 Pseudomonas syringae

La production de phytotoxines a été mise en évidence chez des représentants de pratiquement tous les genres majeurs de bactéries phytopathogènes. Les études les plus documentées concernent des agents pathogènes appartenant au genre *Pseudomonas* et notamment à l'espèce *P. syringae* (Bender *et al.*, 1999). Quatre classes de phytotoxines sont produites par l'espèce *P. syringae*. Ces métabolites appartiennent aux familles des polycétides (coronatines), des lipodepsipeptides composés d'un peptide non ribosomal polaire et d'une queue de type acide gras hydroxylée (syringomycine et syringopeptine), des β -lactames (tabtoxine), ou des peptides modifiés (phaséolotoxine).

4.2.1 Coronatine

La coronatine dérive d'un polycétide, l'acide coronafacique qui est synthétisé à partir de deux acétyl-CoA, d'un butyryl-CoA, d'un pyruvate et d'un dérivé de l'isoleucine, l'acide coronamique. Il existe une certaine flexibilité dans la spécificité de l'enzyme chargée de catalyser la formation de la liaison amide entre le conjugué et l'acide coronafacique. En effet, on retrouve de nombreux analogues de la coronatine dont la

structure diffère de par la nature du conjugué (Figure 25) (Mitchell, 1985 ; Michell & Young, 1985). La biosynthèse de coronatine a été démontrée chez cinq pathovars de *P. syringae* (pv. *atropurpurea*, *glycinea*, *maculicola*, *morsprunorum* et *tomato*), avec une localisation plasmidique des gènes de biosynthèse (toutefois non exclusive). Cette localisation permet d'expliquer la relative instabilité de structure des coronatines d'une souche à l'autre (Cuppels & Ainsworth, 1995).

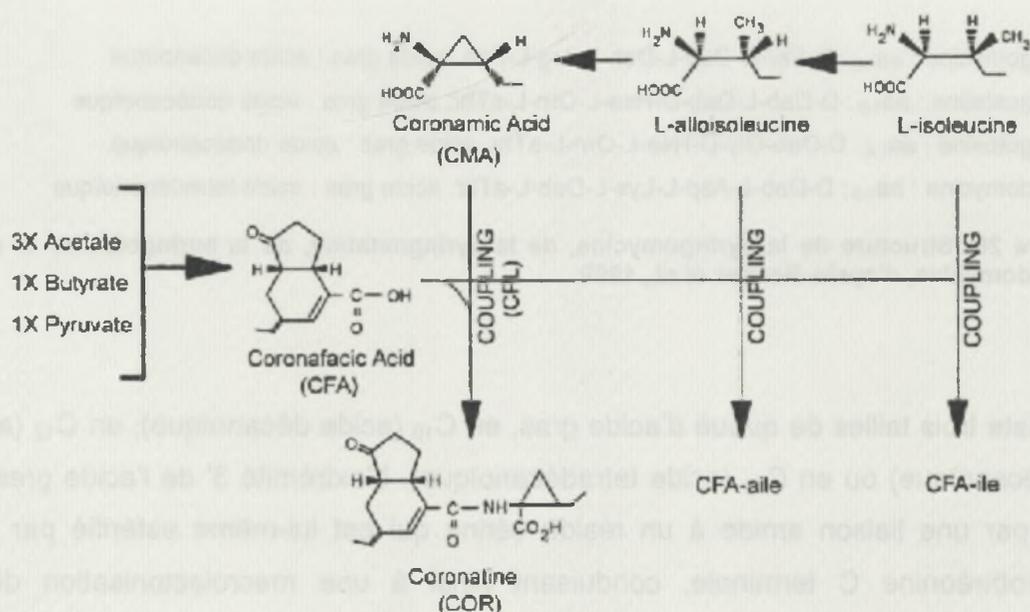


Figure 25 : Schéma des voies de biosynthèse de la coronatine (Bender *et al.*, 1999)

La souche modèle pour la biosynthèse de la coronatine est *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180, chez laquelle il a été démontré que l'ensemble des gènes de biosynthèse étaient regroupés sur un plasmide de 90 kb (Bender *et al.*, 1993). Un des symptômes liés à la production de coronatine est notamment une chlorose diffuse qui peut être induite par simple administration de la toxine chez de nombreuses plantes (Gananamaickam *et al.*, 1982). Par ailleurs, il existe une similitude d'action entre la coronatine et le méthyl Jasmonate, un régulateur de croissance de la plante. Le méthyl Jasmonate est un dérivé de la voie de signalisation des octadécanoïdes, dont la production est activée par un stress biologique (Sembdner & Partither, 1993).

4.2.2 Syringomycine

La Syringomycine est le chef de file des lipodépsinonapeptides, des phytotoxines composées d'une tête polaire cyclique, de nature peptidique (9 résidus) (Segre *et al.*, 1989) et d'une queue d'acide gras 3' hydroxylée hydrophobe (Figure 26).



Syringomycine : aa₁₋₆ : D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe, acide gras : acide décanoïque

Syringostatine : aa₁₋₆ : D-Dab-L-Dab-D-Hse-L-Orn-L-aThr, acide gras : acide dodécanoïque

Syringotoxine : aa₁₋₆ : D-Dab-Gly-D-Hse-L-Orn-L-aThr, acide gras : acide dodécanoïque

Pseudomycine : aa₁₋₆ : D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr, acide gras : acide tetradécanoïque

Figure 26: Structure de la syringomycine, de la syringostatine, de la syringotoxine et de la pseudomycine, d'après Bender *et al.*, 1999.

Il existe trois tailles de queue d'acide gras, en C₁₀ (acide décanoïque), en C₁₂ (acide dodécanoïque) ou en C₁₄ (acide tetradécanoïque). L'extrémité 3' de l'acide gras est liée par une liaison amide à un résidu sérine qui est lui-même estérifié par la 4-chlorothréonine C terminale, conduisant ainsi à une macrolactonisation de la molécule. La structure de la tête polaire varie également par sa composition en amino-acides non usuels du côté carboxyterminal (acide 2,3-déhydroaminobutyrique, acide 3-hydroxyaspartique et 4-chlorothréonine). Les syringomycines sont produites par la plupart des souches de *P. syringae* pv. *syringae*, et provoquent une nécrose des tissus végétaux. Les propriétés amphipatiques des syringomycines facilitent l'insertion de la toxine dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique, induisant la formation de pores perméables aux cations. Il en résulte une augmentation des flux transmembranaires en ions K⁺, H⁺ et Ca²⁺ fatale pour la cellule. Ce mode d'action par ailleurs largement décrit pour les pathogènes animaux est le premier exemple d'un facteur de virulence d'une bactérie phytopathogène ciblant la membrane plasmique de l'hôte végétal et formant un canal induisant une cytolysse (Hutchinson *et al.*, 1995). Une autre propriété des syringomycines est leur activité de surfactant qui jouerait un rôle important dans la dissémination de la bactérie sur la plante en réduisant la tension superficielle de l'eau et en concentrant les quelques rares nutriments à l'interface avec le solvant

(Hutchinson *et al.*, 1995). Enfin, en plus de leur activité de surfactant et de phytotoxine, les syringomycines ont un effet fongicide. Ces propriétés ont été capitalisées pour tenter de contrôler des pathogènes humains importants, tels que les *Candidae*. Les applications cliniques sont toutefois limitées à cause de leur activité hémolytique (Sorensen *et al.*, 1996). La biosynthèse des syringomycines fait intervenir des mécanismes de synthèse peptidique non ribosomale, étant donné la nature non protéinogénique des acides aminés composant leur partie peptidique. La syringomycine est synthétisée par quatre protéines (SyrB1, SyrB2, SyrC et SyrE) codant pour des peptide synthétases non ribosomales (NRPS pour "Non Ribosomal Peptide Synthase"). Brièvement une NRPS est une mégasynthase modulaire catalysant la formation d'un peptide, chaque module étant responsable de l'activation spécifique et de l'incorporation d'un acide aminé (pour plus de détails voir Chapitre II 1.1.1). La sérine N terminale de la syringomycine est activée (par adénylation) puis prise en charge par l'enzyme SyrE, puis l'activité thioestérase de la protéine SyrC catalyse l'hydrolyse du 3-hydroxydodecanoyl-CoA. Il en résulte un transfert de l'acide gras 3' hydroxylé sur le groupement amine de la sérine N terminale. Ce conjugué est ensuite transféré sur le second module de SyrE qui y incorpore un second acide aminé, la D-sérine. Par un procédé itératif, chaque intermédiaire est transféré d'un module au module suivant jusqu'au huitième et dernier module de SyrE (Guenzi *et al.*, 1998). L'octapeptide ainsi obtenu est alors transféré sur SyrB1 qui catalyse l'incorporation de la L-thréonine qui serait alors modifiée en 4 chloro L-thréonine par SyrB2. SyrB2 serait également responsable de la libération de la syringomycine après macrolactonisation. Après cyclisation du peptide, la syringomycine est exportée à travers la membrane cytoplasmique par SyrD, un transporteur de type ATP binding cassette.

4.2.3 Syringopeptine

La syringopeptine constitue la seconde classe des lipodepsipeptides synthétisés par *P. syringae* pv. *syringae*. A l'inverse des lipodepsinonapeptides, les syringopeptines comportent un peptide cyclique composé de 22 à 25 acides aminés selon la souche étudiée (Figure 27). L'acide aminé N terminal (un 2,3 déhydro-aminobutyrate) est acylé par un 3' hydroxydécanoate ou un 3' hydroxydodécanoate. La tyrosine C terminale forme une liaison ester avec l'allothréonine située sept résidus en amont, ce qui aboutit à une lactonisation du peptide. Le cycle peptidique carboxyterminal est

composé de résidus cationiques qui, en lien avec la queue hydrophobe de la syringopeptine, participe à la perméabilisation des membranes. Ce cycle est par conséquent critique pour l'activité biologique de la toxine (Ballio *et al.*, 1996). Le mode d'action et l'activité phytotoxique de la syringopeptine sont très proche de celui de la syringomycine. La toxine forme des pores dans la membrane plasmique de la cellule végétale, ce qui provoque un flux transmembranaire d'ions aboutissant à la mort cellulaire. Les spectres d'action antimicrobiens de la syringopeptine et de la syringomycine divergent largement, certaines souches sensibles à une toxine sont résistantes à l'autre et réciproquement. Ces données sont en contradiction avec les similitudes de mode d'action des deux toxines sur la cellule végétale (formation de pores). La base biologique de ces différences demeure inconnue.

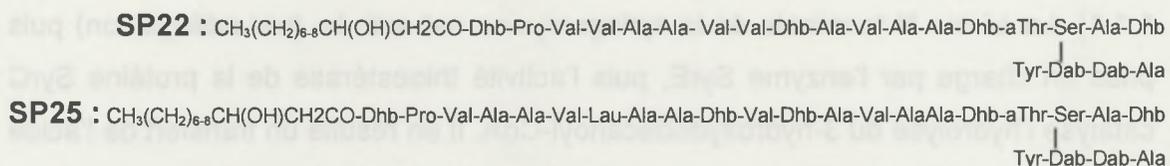


Figure 27 : Structure des formes SP22 et SP25 de la syringopeptine. L'acide gras est de l'acide 3-hydroxydécanoïque ou de l'acide 3-hydroxydodecanoïque

La syringopeptine est également synthétisée par une NRPS, mais celle-ci est différente de la NRPS synthétisant la syringomycine. Les NRPS impliquées dans la biosynthèse de la syringopeptine ne sont pas caractérisées, néanmoins le groupement des gènes de biosynthèse a été localisé directement en aval de celui des gènes de biosynthèse de la syringomycine (Scholz-Schroeder *et al.*, 2001 ; 2003).

4.2.4 Tabtoxine

La tabtoxine est un β -Lactame monocyclique produit par les pathovars *tabaci*, *coronafaciens* et *garcae* de *P. syringae*. Ce dipeptide est composé d'un noyau tabtoxine β lactame (T β L) lié par une liaison peptidique à un résidu thréonine. C'est en fait l'hydrolyse de cette liaison peptidique par une aminopeptidase d'origine végétale ou bactérienne qui libère le composé toxique (Figure 28), et le noyau T β L inhibe irréversiblement la glutamine synthétase (Thomas *et al.*, 1983).



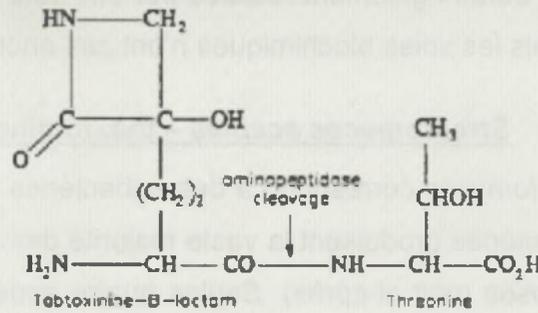


Figure 28 : Structure de la tabtoxine (Bender *et al.*, 1999)

L'inhibition de la glutamine synthétase, outre le fait que cette enzyme soit essentielle à la voie majeure de biosynthèse de glutamine dans la plante, a principalement pour effet de bloquer l'unique voie de détoxication de l'ammoniaque *in planta*. La glutamine synthétase endogène est quant à elle adénylée, ce qui la rend moins sensible à l'action de la tabtoxine (Knight *et al.*, 1986). La voie de biosynthèse de la tabtoxine a été identifiée grâce à l'incorporation de précurseurs radio marqués (L-thr, L-asp sont les précurseurs de la chaîne latérale, pyruvate et méthyle -provenant de la méthionine- du noyau β lactame).

4.2.5 Phaséolotoxine

La phaséolotoxine est produite par *P. syringae* pv. *phaseolicola* et *P. syringae* pv. *actinidae*. La structure de la toxine révélée par Mitchell (1976) consiste en un tripeptide (ornithine, alanine, homo arginine) lié à un sulfodiaminophosphinyl. La phaséolotoxine inhibe l'ornithine carbamoyl transférase, une enzyme clé du cycle de l'urée. La phaséolotoxine est un inhibiteur réversible de cette enzyme. En revanche, l'octicine produite par hydrolyse de la phaséolotoxine par une peptidase végétale, inhibe de façon irréversible l'ornithine carbamoyl transférase. L'inhibition de cette enzyme cause l'accumulation d'ornithine et une déplétion en arginine intracellulaire, qui est à l'origine de la chlorose. *P. syringae* pv. *phaseolicola* produit deux isoformes d'ornithine carbamoyl transférase car le cycle de l'urée est également critique chez les bactéries. Une isoforme de l'enzyme est sensible à la phaséolotoxine et l'autre y est insensible. La bactérie produit donc une isoforme ou l'autre en fonction de la production de phaséolotoxine (Peet *et al.*, 1986). La biosynthèse de la

phaséolotoxine serait également réalisée par une voie impliquant une NRPS (Turgay *et al.*, 1997) mais les voies biochimiques n'ont pas encore été caractérisées.

4.3 *Streptomyces scabies* – thaxtomine

Le genre *Streptomyces* correspond à des eubactéries du sol ayant un génome riche en GC. Ces bactéries produisent la vaste majorité des antibiotiques connus ainsi que d'autres composés (voir ci-après). Seules quatre espèces de *Streptomyces* ont été décrites comme étant pathogènes des plantes : *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* et *S. ipomoeae*. Ces quatre espèces sont responsables de la galle des tubercules et produisent une phytotoxine appelée thaxtomine, un dipeptide cyclique (Healy *et al.*, 2000). La thaxtomine purifiée est capable d'induire des symptômes *in planta* et des mutants avirulents ou de virulence réduite ne produisent pas ou très peu de toxine (Goyer *et al.*, 1998). Bien que présentant des différences taxonomiques, les quatre espèces de *Streptomyces* phytopathogènes produisent une toxine de type thaxtomine, ce qui suggère un transfert horizontal d'un îlot de pathogénie (Healy & Lambert, 1991). Les travaux de Healy sur cet îlot de pathogénie ont conduit à la caractérisation des deux gènes structuraux de biosynthèse de la thaxtomine, TxtA et TxtB (Healy *et al.*, 2000), qui codent pour une peptide synthétase non ribosomale. (voir chapitre II 1.1).

4.4 *Bradyrhizobium* spp.– rhizobitoxine

La rhizobitoxine est synthétisée par des bactéries symbiotiques des légumineuses appartenant au genre *Bradyrhizobium*, ainsi que par une bactérie phytopathogène, *Burkholderia andropogonis*. La rhizobitoxine est considérée comme une toxine car elle induit une chlorose foliaire chez le soja (Johnson *et al.*, 1959). D'un point de vue biochimique, la rhizobitoxine inhibe les voies de biosynthèse de la méthionine et de l'éthylène par blocage de la β -cystathionase (Xiong & Fuhrmann, 1996) et de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (Yasuta *et al.*, 1999 ; 2001), respectivement. Le blocage de la biosynthèse d'éthylène serait un avantage sélectif car il accroîtrait la capacité de nodulation chez *Macropitilium atropurpureum* infecté par *B. elkanii* (Yuhashi *et al.*, 2000). En utilisant une approche combinée de mutagenèse dirigée et de détermination de la structure des intermédiaires de biosynthèse, Yasuta *et al.* (2001) ont proposé un modèle de biosynthèse de la rhizobitoxine. Brièvement, cette molécule est synthétisée par condensation du sérinol

(un dérivé de la dihydroacétone) avec un intermédiaire dans la biosynthèse de la méthionine (situé juste en amont de la β -cystathionase), l'O-acétylhomosérine.

4.5 Xanthomonas albilineans – albicidine

4.5.1 L'albicidine : une composante majeure du pouvoir pathogène

Dès les années 40, Orian (1942) proposa l'implication d'un métabolite secondaire toxique agissant sur la formation des chloroplastes pour expliquer leur absence des tissus chlorotiques de canne à sucre atteinte d'échaudure des feuilles. Bien qu'il n'ait pas été possible de démontrer l'implication d'une phytotoxine par le test classique d'induction de symptômes avec différentes fractions de milieu de culture de *X. albilineans*, différents arguments expérimentaux ont permis à Birch (1987b) de démontrer l'implication de l'albicidine dans le pouvoir pathogène de la bactérie : i) des mutants d'insertion *tox*⁻, incapables de produire la toxine, ne sont pas pathogènes et n'induisent pas de symptômes sur des variétés très sensibles (Birch, 2001); ii) l'albicidine bloque la réplication de l'ADN du chloroplaste qui est bloqué au stade proplaste (Birch & Patil, 1987 a & b); iii) enfin, des cannes à sucre transgéniques exprimant un gène de détoxification de l'albicidine (Zhang & Birch, 1997) sont résistantes à l'échaudure des feuilles (Zhang & Birch, 1999).

4.5.2 Propriétés antibiotiques

L'albicidine est également bactéricide sur une large gamme de bactéries Gram positif et Gram négatif. La toxine bloque sélectivement la synthèse d'ADN chez *Escherichia coli* (Birch & Patil, 1985b) et elle est rapidement accumulée via un pore normalement impliqué dans l'import de nucléosides (*tsx*). Ce pore est également le récepteur du bactériophage T6. La résistance spontanée de *E. coli* à l'albicidine résulte d'une mutation du gène *tsx* ayant pour effet le blocage de l'import des nucléosides par ce pore (Birch *et al.*, 1990).

4.5.3 Caractéristiques chimiques

L'albicidine n'est produite qu'en très faible quantité par *X. albilineans*. Pour cette raison, la structure et la composition chimique de la molécule n'ont pas encore été déterminées. Des données morcelaires de Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du ¹³C ont néanmoins déjà permis de préciser que l'albicidine est un composé aromatique de faible poids moléculaire (environ 842 Da) et composé de 38

atomes de carbone (Birch & Patil, 1985b). L'albicidine est un antibiotique de nature non peptidique, soluble dans les solvants organiques, partiellement soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants moins polaires.

5 Situation du sujet

Dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*, et face aux difficultés de purification de l'albicidine, une étude du déterminisme génétique de la biosynthèse de cette pathotoxine a été initiée en 1993 à l'Université de Floride. Des expériences de mutagenèse insertionnelle à l'aide du mini-transposon Tn5 ont été entreprises par Rott et collaborateurs avec une souche de *X. albilineans* productrice d'albicidine isolée en Floride, Xa23R1. Des études préliminaires ont permis de démontrer une insertion du mini-transposon au hasard dans le génome bactérien, à une fréquence de 10^{-4} à 10^{-5} par cellule bactérienne. Une collection de 7100 mutants d'insertion a été construite et criblée afin d'isoler des mutants touchés dans la production d'albicidine. Cette collection comprenait notamment, 14 mutants albinos (0,2%) non producteurs de pigments xanthomonadines, 71 mutants auxotrophes (1%), c'est à dire incapables de croître sur milieu minimum, et surtout, 57 mutants affectés dans la production d'albicidine (0,8%) et isolés grâce à un test microbiologique basé sur les propriétés antibiotiques de l'albicidine.

Parmi ces 57 mutants touchés dans la production d'albicidine, 50 mutants tox⁻ incapables de produire l'albicidine ont été sélectionnés pour l'étude du déterminisme génétique de la pathotoxine. Une banque d'ADN génomique de la souche Xa23R1 a parallèlement été générée. Cette banque était composée de 845 cosmides comportant un insert d'ADN génomique d'une taille moyenne de 37kb. Les régions flanquantes au site d'insertion du mini-transposon Tn5 ont été clonées chez plusieurs mutants tox⁻. Elles ont ensuite été utilisées comme sondes afin de cribler la banque d'ADN génomique de Xa23R1. Les cosmides ainsi sélectionnés ont été utilisés pour des tests de complémentation afin de vérifier que ces cosmides étaient bien capables de restaurer la production d'albicidine chez les mutants tox⁻ ayant servi à les identifier. Une série de 4 cosmides dont deux chevauchants a permis de compléter l'ensemble des 50 mutants tox⁻ (Tableau 1). Trois régions génomiques impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine (XALB1, XALB2 et XALB3) ont ainsi été identifiées.

Tableau 1 : Résultats des tests de complémentation des mutants tox⁻ par les cosmides de la banque génomique de Xa23R1 (Rott *et al.*, 1996 ; Royer *et al.*, 2004)

Cosmide	Nombre de mutants tox ⁻ complémentés	Région du génome de Xa23R1
pALB571 (36kb)	44 (88%)	XALB1
pALB540 (47kb)	20 (40%) dont un mutant non complémenté par pALB571	XALB1
pALB389 (37 kb)	2 (4%)	XALB2
pALB639 (36kb)	3 (6%)	XALB3

Le séquençage des régions génomiques XALB1 et XALB2 a permis de mettre en évidence vingt et un ORFs (*albl* à *albXXI*). La comparaison de la séquence obtenue avec celle des gènes impliqués dans d'autres systèmes de biosynthèse d'antibiotiques a permis d'attribuer à chacun de ces ORFs une fonction et de proposer un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une structure théorique du squelette de la molécule (Royer 2004). Les travaux concernant la confirmation de l'implication de trois gènes majeurs dans la biosynthèse d'albicidine (*albl*, *albIV* et *albIX*) présentés dans cet article ont été réalisés dans le cadre de la présente thèse.

La suite des travaux présentés dans ce manuscrit, a pour but de compléter la caractérisation de l'albicidine et de valider le modèle théorique des voies de biosynthèse de l'albicidine.

Deux axes complémentaires seront par conséquent présentés à la suite du modèle :
i) la caractérisation de la troisième région, XALB3, impliquée dans la biosynthèse de l'albicidine et ii) la production d'albicidine en système hétérologue.

CHAPITRE II :

**L'ALBICIDINE, PATHOTOXINE PRODUITE PAR *X. ALBILINEANS*,
EST SOUS LA GOUVERNANCE D'UNE REGION CONTENANT
TROIS GENES DE GRANDE TAILLE CODANT POUR DES PKS ET NRPS
AINSI QUE PLUSIEURS GENES PUTATIFS DE MODIFICATION,
DE RESISTANCE ET DE REGULATION**

Résumé

L'albicidine joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de *Xanthomonas albilineans* chez la canne à sucre et possède également des propriétés antibiotiques. Cette phytotoxine n'est produite qu'en très faible quantité par *X. albilineans*. Pour cette raison, la structure et la composition chimique de la molécule n'ont pas encore été déterminées.

Trois régions génomiques impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine ont été identifiées par complémentation d'une collection de mutants d'insertion Tn5 non producteurs de toxine avec une banque d'ADN de *X. albilineans*. Ce chapitre présente l'identification et le séquençage de deux de ces trois régions. Ces résultats ont permis de mettre en évidence 18 gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine chez *X. albilineans*. Parmi ceux-ci, trois gènes (*abl*, *ablV* et *ablX*) codant pour des polycétide synthases (PKS) et pour des peptide synthases non ribosomales (NRPS) sont formellement impliqués dans la biosynthèse du squelette de la molécule. D'autres gènes, identifiés *in silico*, codent pour des protéines putatives de modification, de résistance et de régulation. La structure des trois enzymes PKS et NRPS a permis de proposer un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une composition chimique et une structure théoriques du squelette de la molécule en accord avec les données structurales partielles connues de l'albicidine.

1 Introduction

Les études des bases génétiques de la pathogénie des bactéries phytopathogènes ont abouti à l'identification de gènes jouant un rôle clé au cours des interactions plantes-microorganismes, tels que les gènes *avr* et *hrp*. Néanmoins, d'autres gènes peuvent aussi jouer un rôle crucial dans la pathogenèse, et notamment ceux qui codent pour des toxines qui interviennent dans la virulence ou l'agressivité de certaines bactéries. L'albicidine est la composante majeure d'un complexe de toxines produit par *X. albilineans*, une bactérie pathogène de la canne à sucre qui provoque une bactériose vasculaire appelée échaudure des feuilles (Birch, 2001). Cette toxine est impliquée dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans* et agit en inhibant la réplication de l'ADN chloroplastique. Elle possède également un pouvoir bactéricide à l'égard d'une large gamme de bactéries pathogènes de l'homme et des animaux et présente donc un intérêt thérapeutique. La purification de ce métabolite secondaire à partir de *X. albilineans* est difficile, notamment à cause des faibles quantités produites par la bactérie. C'est pour cette raison que i) le mode d'action de l'albicidine au cours de la pathogenèse n'a pas encore été entièrement élucidé, ii) sa structure n'a pas encore été déterminée et iii) son utilisation en tant qu'antibiotique et ses autres éventuelles propriétés pharmacologiques n'ont pas encore été évaluées. Des recherches ont été initiées en 1993 à l'Université de Floride et poursuivies au CIRAD à Montpellier pour cloner les gènes impliqués dans la production de l'albicidine chez *X. albilineans* (Rott *et al.*, 1996). L'ensemble de ces gènes a été cloné et séquencé. La comparaison de la séquence obtenue avec celles des gènes impliqués dans d'autres systèmes de biosynthèse d'antibiotiques a permis d'identifier trois gènes majeurs : *albI*, *albIV* et *albIX*. Ces gènes codent pour des mégasynthèses modulaires de type polycétide synthase (PKS, pour « Polyketide Synthase ») et peptide synthase non ribosomale (NRPS, pour « Non Ribosomal Peptide Synthase »). D'autres gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine codent pour des protéines putatives de régulation, de modification et de résistance.

Les enzymes PKS et NRPS partagent un modèle structural similaire. Elles sont modulaires, multi-fonctionnelles, de très grande taille (la protéine *AlbI* est composée de 6879 résidus) et catalysent la biosynthèse de polymères (un polycétide dans le cas des PKS et un peptide dans le cas des NRPS). Ainsi, un polycétide est-il

composé d'une succession d'acyls condensés à partir de diverses molécules d'acyl coenzyme A (acétyl Coenzyme A, malonyl Co-A méthyl-malonyl Co-A, etc.). De manière similaire, un peptide non ribosomal est composé d'une succession d'acides aminés (dont la nature diffère souvent des 20 acides aminés naturels protéinogènes). La particularité de ce peptide est son mode de biosynthèse, qui ne fait pas intervenir la machinerie cellulaire classique de transcription et de traduction. PKS et NRPS partagent un mode de fonctionnement très similaire

1.1 Les NRPS

La structure d'un peptide non ribosomal, sa taille et sa complexité sont directement corrélés au nombre, à l'ordonnement et à la structure de chacun des modules composant la NRPS qui le synthétise. Chaque module au sein d'une NRPS gouverne l'incorporation d'un acide aminé et, par conséquent, la succession des modules gouverne la succession des acides aminés incorporés selon un mode séquentiel (Lautru & Challis, 2004). Une NRPS joue donc à la fois le rôle de matrice (puisque c'est la nature et la succession des modules qui détermine l'ordonnement des acides aminés du peptide non ribosomal) et de machinerie biosynthétique (chaque module fournissant l'intégralité de la machinerie catalytique). Les NRPS étant des enzymes modulaires multifonctionnelles, leur taille peut être impressionnante, en particulier dans le cas des NRPS fongiques qui sont en général monocistroniques. Ainsi, la cyclosporine A de *Tolypocladium niveum* est synthétisée par une NRPS composée de 11 modules ayant une taille totale d'environ 1,6 MDa! (Weber *et al.*, 1994). Chez les bactéries, les différents modules responsables de la synthèse d'un peptide non ribosomal sont généralement sous la gouvernance de plusieurs gènes codant pour des NRPS éventuellement organisés en opérons. La plus grande NRPS bactérienne a été décrite chez *Pseudomonas syringae*. Il s'agit de la syringomycine synthétase qui comporte 8 modules (Guenzi *et al.*, 1998). L'organisation de NRPS en modules et en domaines n'est pas simplement un modèle basé sur la présence de structures et de motifs conservés, chaque domaine est une unité fonctionnelle (Challis & Naismith, 2004). Un domaine peut être excisé de la chaîne polypeptidique composant une NRPS. Le domaine excisé conserve son activité catalytique, ce qui permet d'envisager la manipulation de ces mégasynthèses pour générer de nouvelles molécules (cet aspect sera discuté au chapitre IV).

1.1.1 Structure et fonctionnement d'une NRPS

Un module est composé d'au moins trois domaines fonctionnels individuels. Ceux-ci sont respectivement responsables de l'activation du substrat (A pour adénylation), de la liaison au polymère en cours d'élongation (PCP pour "peptidyl carrier protein") et de la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé adénylé et le peptide en cours d'élongation (C pour condensation). Ces trois domaines constituent le cœur d'un module. Seul le premier module (module d'initiation) ne comporte pas de domaine C actif, son rôle étant simplement d'initier la synthèse en activant un acide aminé et en le greffant sur le domaine PCP adjacent (Doekel & Marahiel, 2000).

Chaque module active spécifiquement un acide aminé par une réaction en deux temps et en faisant intervenir deux domaines adjacents (Figure 29). Le domaine d'adénylation (A) sélectionne spécifiquement un acide aminé et l'active par une réaction d'adénylation. La partie aminoacyl est alors covalentement attachée par une liaison thioester au groupement SH fourni par le groupe prosthétique phosphopantéthéinyl (Ppant) du domaine de thiolation adjacent. Le groupe prosthétique Ppant du domaine PCP est ajouté par modification post traductionnelle par une enzyme appelée phosphopantéthéinyltransférase. L'élongation du peptide en cours de synthèse se fait séquentiellement et unidirectionnellement sous le contrôle du domaine de condensation (C). Ce domaine catalyse la formation d'une liaison peptidique par attaque nucléophile du peptidyl-S-Ppant du module n , par l' aminoacyl-S-Ppant monomérique du module $n+1$.

D'autres domaines annexes peuvent être également trouvés au sein d'un module. Ces domaines sont responsables de modifications de la structure de l'acide aminé incorporé, comme le domaine d'épimérisation. D'autres domaines sont responsables de modification du peptide en cours d'élongation, comme les domaines de méthylation, de cyclisation, ou d'oxydation.

Lorsque le peptide non ribosomal a atteint sa taille définitive (c'est-à-dire qu'il est arrivé au dernier module), il est libéré de la NRPS par le domaine TE (pour thioestérase) qui est responsable de l'hydrolyse de la liaison thioester entre le peptide et le groupement phosphopantéthéinyl de l'ultime domaine PCP (Figure 29). La libération du peptide peut s'accompagner d'une macrolactonisation (cyclisation) de la molécule.



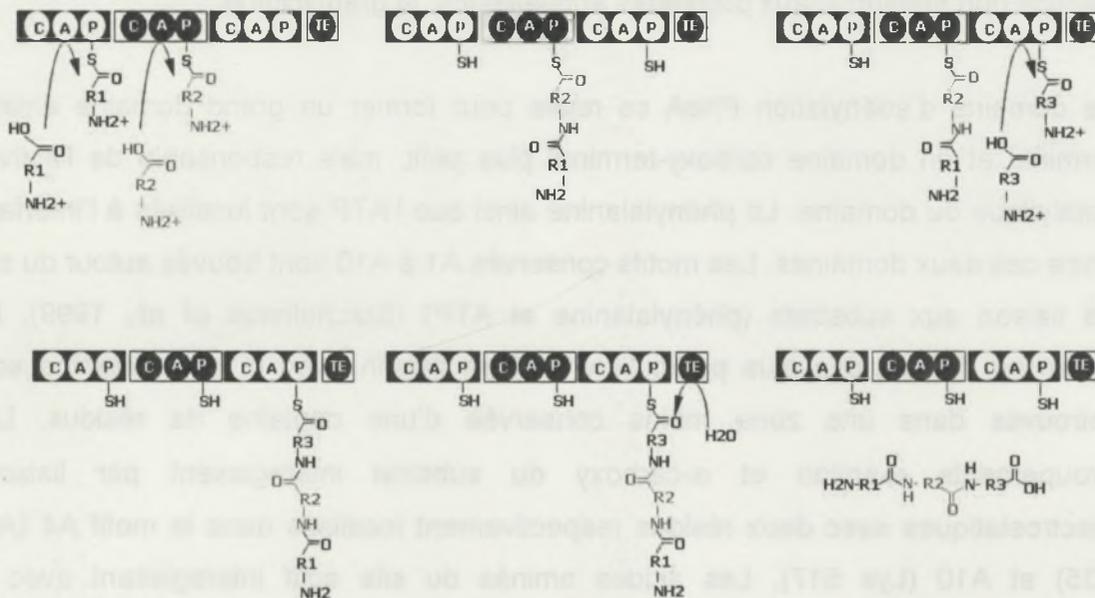


Figure 29 : Fonctionnement schématique d'une NRPS. La séquence des étapes successives de catalyse est détaillée dans le texte

1.1.1.1 Domaine d'adénylation

Il existe une très forte spécificité de chaque domaine d'adénylation (dont la taille est d'environ 500 aa) pour un acide aminé donné. Les substrats spécifiés par plus de 180 domaines d'adénylation ont été identifiés (Ackerley *et al.*, 2003). Ces substrats peuvent être soit l'un des 20 acides aminés constitutifs des protéines soit un acide aminé non protéinogène (comme, par exemple l'acide picolinique, le diaminobutyrate, ou encore l'acide salicylique, cf Tableau 2). De nombreuses études biochimiques ont identifié le domaine d'adénylation comme étant le domaine responsable de la spécificité de substrat d'un module NRPS (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000, May *et al.*, 2002). Les alignements de séquence de différents modules d'adénylation ont permis d'identifier dix motifs conservés (A1 à A10), et ces derniers sont vraisemblablement impliqués dans la liaison du domaine d'adénylation au substrat correspondant. Cependant, la nature et les mécanismes des éléments conférant la spécificité de substrats n'a été éludée que grâce à des analyses cristallographiques et à la résolution de la structure tridimensionnelle du

domaine d'adénylation responsable de l'activation de la phénylalanine de la gramycidine synthase (PheA) (Conti *et al.*, 1997). Cette enzyme synthétise un peptide non ribosomal aux propriétés antibiotiques, la gramycidine.

Le domaine d'adénylation PheA se replie pour former un grand domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal plus petit, mais responsable de l'activité catalytique du domaine. La phénylalanine ainsi que l'ATP sont localisés à l'interface entre ces deux domaines. Les motifs conservés A1 à A10 sont trouvés autour du site de liaison aux substrats (phénylalanine et ATP) (Stachelhaus *et al.*, 1999). En revanche, les résidus plus particulièrement en liaison avec la phénylalanine sont retrouvés dans une zone moins conservée d'une centaine de résidus. Les groupements α -amino et α -carboxy du substrat interagissent par liaisons électrostatiques avec deux résidus respectivement localisés dans le motif A4 (Asp 235) et A10 (Lys 517). Les acides aminés du site actif interagissant avec la phénylalanine sont localisés de part et d'autre du substrat (Ala236, Ile330 et Cys331 d'un côté, Ala322, Ala301, Ile299 et Thr278 de l'autre), et sont séparés par le noyau indole du résidu Trp239. Ces données structurales ont été confrontées aux données de séquences de nombreux autres domaines d'adénylation, ce qui a permis d'élaborer un modèle qui a ensuite été validé par mutagenèse dirigée (Stachelhaus *et al.*, 1999, Challis *et al.*, 2000).

Ces modèles permettent de prédire la nature de l'acide aminé activé par un domaine d'adénylation donné sur la base de sa séquence primaire (Tableau 2). Ce modèle se traduit par une séquence signature de dix acides aminés qui dictent la nature du substrat incorporé par un domaine d'adénylation donné (von Döhren *et al.*, 1999). Ce code non ribosomal a depuis été étendu aux domaines d'adénylation incorporant des acides carboxyliques (et non plus seulement des acides aminés) avec l'élucidation de la structure tridimensionnelle du domaine d'adénylation DhbE responsable de l'incorporation de 2, 3- di hydroxy benzoate de *Bacillus subtilis* (May, 2002).

Tableau 2 : Modèle prédictif du code non ribosomal, d'après Stachelhaus *et al.*, 1999.

Domaine	Position										NRPS
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
Aad	E	P	R	N	I	V	E	F	V	K	AcvA
Ala	D	L	L	F	G	I	A	V	L	K	CssA, Hts1
Asn	D	L	T	K	L	G	E	V	G	K	BacA, CepA, Dae, Gig1, TycC
Asp	D	L	T	K	V	G	H	I	G	K	BacC, SrfA, LicB, LchAB
Cys	D	H	E	S	D	V	G	I	T	K	AcvA
Cys	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	BacA, HMWP2
Dab	D	L	E	H	N	T	T	V	S	K	SyrE
Dhb/Sal	P	L	P	A	Q		V	V	N	K	EntE, DhbE, MbtA, PchD, VibE, YbtE
Gin	D	A	Q	D	L	G	V	V	D	K	LicA, LchAa
Glu	D	A	W	H	F	G	G	V	D	K	FenA, FenC, FenE, PPS1, PPS3, PPS4
Glu	D	A	K	D	L	G	V	V	D	K	BacC, SrfAA
Ile	D	G	F	F	L	G	V	V	Y	K	BacA, BacC, LicC, LchAC
Ile	D	A	F	F	Y	G	I	T	F	K	FenB, PPS5
Leu	D	A	W	F	L	G	N	V	V	K	BacA, LicA, LchAA, LicB, LchAB, SrfAA, SrfAB
Leu	D	A	W	L	Y	G	A	V	M	K	CssA
Leu	D	G	A	Y	T	G	E	V	V	K	GrsB, TycC
Leu	D	A	F	M	L	G	M	V	F	K	LicA, LchAA, SrfAA
Orn	D	M	E	N	L	G	L	I	N	K	FxbC
Orn	D	V	G	E	I	G	S	I	D	K	BacB, FenC, GrsB, PPS1, TycC
Phe	D	A	W	T	I	A	A	L	C	K	GrsA, SndDE, TycA, TycB
Phg/hPhg	D	I	F	L	L	G	L	L	C	K	CepB, CepC, SnbDE
Pip/Pip@	D	F	Q	L	L	G	V	A	V	K	FkbP, RapP, SnbA, SnbDE
Pro	D	V	Q	L	I	A	H	V	V	K	GrsB, FenA, PPS4, SnbDE, TycB
Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	EntF, SyrE
Thr/Dht	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	AcmbB, Fxb, PPS2, PyoD, SnbC, SyrB, SyrE
Tyr	D	G	T	I	T	A	E	V	A	K	FenA, PPS2, PPS4
Tyr	D	A	L	V	T	G	A	V	V	K	TycB, TycC
Tyr	D	A	S	T	V	A	A	V	C	K	BacC, CepA, CepB
Val	D	A	F	W	I	G	G	T	F	K	GrsB, FenE, LibB, LchAB, PPS3, SrfAB, TycC
Val	D	F	E	S	T	A	A	V	Y	K	AcvA
Val	D	A	W	M	F	A	A	V	L	K	CssA
variabilité	3%	16%	16%			13%	26%	23%	26%	0%	

Substrats non protéinogéniques : Aad : δacide L α -aminoadipique ; Dab : 2,3-Diaminobutyrate ; Dhb : 2,3-Dihydrobenzoate ; Sal : acide salicylique ; Phg : L-Phénylglycine, hPhg : 4-hydroxy-L-Phénylglycine ; Pip : acide pipercolinique ; Dht : dehydrothréonine ; Orn : Ornithine.

1.1.1.2 Domaine PCP ("Peptidyl Carrier Protein")

Le domaine PCP est un domaine de petite taille (80 à 100 aa). Il constitue le domaine de transfert dont le rôle est d'être accepteur de l'acide aminé activé par le domaine A covalentement lié sous la forme d'un thioester au Ppant (Stachelhaus *et al.*, 1996). Le Ppant est greffé sur le module par modification post traductionnelle. Il fonctionne comme un bras flexible de 20 Å permettant le transfert de l'aminoacyl activé d'un site catalytique à un autre. Les PCP appartiennent à la superfamille des "Carrier Proteins" (CP) qui partagent des similarités de structure. Bien que différant de par la nature des substrats qu'ils transportent (PCP pour "Peptidyl CP", ACP pour "Acyl CP" des PKS et des acides gras synthétase, voir ci-après section 1.2) et par une séquence en acide aminé peu conservée, toutes les CPs présentent une structure en faisceau composé de quatre hélices α . L'unique domaine conservé des

CPs est la séquence entourant le résidu sérine invariant (core ser) sur lequel est greffé le Ppant (Weber *et al.*, 2000; Crump *et al.*, 1997 ; Findlow *et al.*, 2003)

1.1.1.3 Domaine de condensation

Ce domaine de 450 aa environ est le cœur du module NRPS. En effet, c'est ce domaine qui catalyse la formation de la liaison peptidique entre l'amino-acyl activé et le peptide en cours d'élongation, respectivement fixés sur deux Ppant de deux PCP adjacents. Ce domaine catalyse l'attaque nucléophile du groupement amino de l'acide aminé activé du module n sur le groupement acyl de l'acide aminé porté par le module n+1 (Figure 30).

D'après le " thiotemplate model " de Stein *et al.* (1996), le domaine C possède deux sites de fixation du substrat qui sont respectivement de part et d'autre du site actif du domaine. Le domaine pour la fixation du nucléophile est localisé sur la face C terminale (par rapport à l'orientation générale de la NRPS), et l'autre site pour la fixation de l'électrophile, est localisé sur la face N terminale. Ainsi, l'électrophile entre dans le site actif du côté amont et le nucléophile du côté aval du site catalytique. Une fois la liaison peptidique formée, le dipeptide formé peut jouer le rôle d'électrophile pour le site actif du domaine C suivant. Là encore, ce modèle n'était qu'une hypothèse de travail jusqu'à ce que la structure tridimensionnelle de VibH, une amide synthase ressemblant fortement aux NRPS soit déterminée (Keating *et al.*, 2002).

Enfin, le domaine de condensation est aussi impliqué dans la synthèse unidirectionnelle du peptide non ribosomal et dans la spécificité de substrat. Belshaw *et al.* (1999) ont démontré qu'il existait une spécificité du domaine C pour un substrat nucléophile donné (le substrat " entrant " dans le peptide en cours d'élongation). Ces données ont depuis été confirmées (Mootz *et al.*, 2000 ; Doekel & Marahiel, 2000) pour le substrat nucléophile. En revanche, il n'existe pas de spécificité particulière au niveau du site de fixation du substrat électrophile. En conclusion, outre la fonction de catalyse de la formation de la liaison peptidique, le domaine de condensation présente une spécificité pour le substrat entrant, ce qui oriente le sens de la synthèse et constitue une sécurité permettant d'éviter de former une liaison peptidique entre deux peptides en cours d'élongation adjacents (ce qui serait le cas si un domaine C acceptait un substrat nucléophile provenant du module situé

directement en aval – Lautru & Challis, 2004). Il est à noter que le domaine C est généralement absent (ou présent mais sous une forme inactive) du premier module NRPS, dit module d'initiation. En effet, le rôle de ce module est d'initier la synthèse du peptide non ribosomal en activant le premier acide aminé qui sera lié au second acide aminé par le domaine C du module numéro 2.

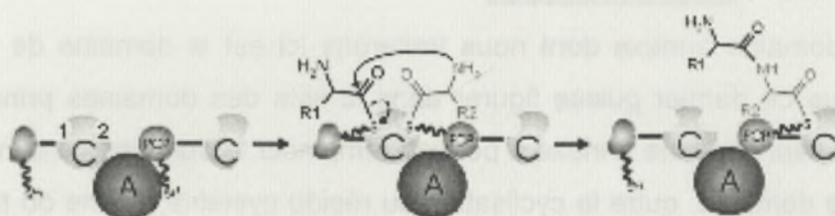


Figure 30 : Mécanisme de catalyse d'un domaine C (d'après Finking & Marahiel, 2004).

1.1.1.4 Domaine thioestérase

Comme pour la sélection et l'activation du substrat, et pour l'incorporation séquentielle des substrats activés, la réaction de terminaison de la synthèse est un processus catalysé par le module le plus distal de la NRPS, le domaine thioestérase. Durant toute la synthèse, le peptide en cours d'élongation est transféré d'un module au module suivant jusqu'à arriver au domaine PCP du dernier module. Ce module contient un domaine d'environ 250 aa dont le rôle est la libération ordonnée du peptide non ribosomal. La libération de ce produit se fait par une réaction en deux temps conduisant d'abord à la formation d'un intermédiaire acyl-O-domaine TE. Cet intermédiaire subit ensuite soit une attaque nucléophile du peptide en cours de libération, ce qui conduit à une réaction de macrolactonisation (cyclisation comme dans le cas de surfactine – Tseng *et al.*, 2002), soit une simple hydrolyse, conduisant à la formation d'un peptide linéaire (ex. pyochéline, Patel *et al.*, 2003). Il semble que la macrolactonisation soit le mécanisme le plus favorisé dans la nature, vraisemblablement du fait qu'il confère à la structure peptide un caractère de résistance aux protéases. Ici encore, ce domaine est responsable de la grande diversité de structure des peptides non ribosomiaux, puisque l'on rencontre des domaines TE capables de catalyser la formation d'une structure cyclique branchée, d'une liaison amide entre l'amine terminale d'un peptide et son extrémité C terminale

(cyclosporine A), d'une macrolactonisation (surfactine) voire même la formation d'oligomères de peptides non ribosomaux (gramicidine S, formée de deux pentapeptide têtes bêches, ou entérobactine, tripeptide macrolactonisé). Cette variabilité fonctionnelle est reflétée par le faible niveau de conservation des séquences des domaines TE (seulement 10 à 15%).

1.1.1.5 Domaines annexes

Le premier domaine annexe dont nous traiterons ici est le domaine de cyclisation (Cy), bien que ce dernier puisse figurer dans la liste des domaines principaux. En effet, il est le seul domaine annexe à pouvoir remplacer le domaine de condensation. Le rôle de ce domaine, outre la cyclisation du résidu cystéine, sérine ou thréonine à incorporer, est de former une liaison peptidique avec le peptide en cours d'élongation. La réaction de cyclisation conduit à l'incorporation au peptide non ribosomal d'un hétérocycle thiazoline ou oxazoline.

Ce type d'hétérocycle peut encore subir une réaction d'oxydation supplémentaire, généralement catalysée par un domaine d'oxydation Ox. C'est le cas pour la formation du noyau thiazole de l'épothilone et de la bléomycine pour qui l'oxydation est catalysée par un domaine Ox localisé respectivement au sein du module d'adénylation d'epoA et en aval du domaine PCP (Schneider *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2003).

Une caractéristique particulière des peptides non ribosomaux est qu'ils incorporent de nombreux D-acides aminés. Deux stratégies existent pour l'incorporation de ces acides aminés non protéinogènes : soit le domaine d'adénylation spécifie la conformation D de l'acide aminé qu'il adényle, soit un domaine annexe d'épimérisation (domaine E) est retrouvé du côté C terminal du module incorporant un D-acide aminé.

Un certain nombre de peptides non ribosomaux sont N- ou C-méthylés, ce qui constitue notamment une stratégie de protection de la dégradation protéolytique. Les réactions de méthylation (en C ou en N) font intervenir la S-adénosyl méthionine (SAM) et un domaine de méthylation, comme c'est par exemple le cas pour la psychéline ou la thaxthomine. Ces derniers sont respectivement N-méthylés en cis

par un domaine inséré dans le domaine d'adénylation des ORF MtfA (pyochéline, Patel *et al.*, 2003) ainsi que txtA et txtB (thaxthomine, Healy *et al.*, 2000).

1.1.1.6 La phosphopantéthéinyl transférase

Afin d'être complet dans le fonctionnement des NRPS, il est nécessaire de faire mention de la Ppt transférase, l'enzyme responsable des modifications post traductionnelles des NRPS, sans laquelle ces mégasynthèses ne pourraient pas fonctionner (cf. paragraphe 1.1.1.2). Le transfert de la partie Phosphopantéthéinyl du coenzyme A sur le résidu serine conservé du PCP permet la conversion de celui-ci de la forme inactive apo-ACP en forme active. La Ppt transférase catalyse l'attaque nucléophile du groupement hydroxyle du résidu sérine conservé de l'apo PCP sur le phosphate β du Ppt. Il en résulte une conversion du PCP de la forme apo en une forme holo-PCP active avec libération d'ADP. L'importance de la Ppt transférase dans l'activation des NRPS a été démontrée chez une souche de *B. subtilis*, comportant une surfactine synthétase intacte, mais mutée pour la Ppt transférase correspondante. Il en résulte une absence d'activation des NRPS de la surfactine synthétase dont l'ensemble des PCP demeure sous la forme apo PCP inactive. Cette absence de modification post traductionnelle se traduit par l'absence de synthèse du métabolite secondaire. La complémentation de cette souche avec une copie fonctionnelle de la Ppt transférase a permis de restaurer la production de surfactine, confirmant le rôle de cette enzyme dans l'activation des NRPS (Nakano *et al.*, 1992).

1.1.2 Trois classes de NRPS

Initialement, le fonctionnement des NRPS était envisagé à travers le dogme de la règle de colinéarité qui stipule que l'ordre hiérarchique des différents modules dictait l'ordre des acides aminés dans le peptide non ribosomal (Cane *et al.*, 1999 ; Keating & Walsh, 1999; Marahiel *et al.*, 1997, Marahiel, 1997). Ce dogme initial permettait de facilement prévoir la structure d'un peptide non ribosomal en se basant simplement sur le code de prédiction de sélectivité des domaines d'adénylation successifs. Cette stratégie s'applique d'ailleurs parfaitement à la surfactine, un peptide non ribosomal cyclique : 24 domaines arrangés en sept modules distribués sur trois NRPS synthétisent ce peptide de façon unidirectionnelle du module 1 jusqu'au domaine TE distal (Peypoux *et al.*, 1999). Les NRPS impliquées dans cette synthèse linéaire sont à présent appelées NRPS de type A.

En revanche, si on applique cette même stratégie à la biosynthèse de la gramycidine S, il est impossible d'aboutir à la structure de ce métabolite qui est un décapeptide cyclique formé par deux pentapeptides covalentement liés. En effet, la gramycidine S est un homodimère synthétisé par deux NRPS (GrsA et GrsB) dont les 5 modules successifs catalysent la formation d'un premier peptide qui n'est pas libéré du domaine TE. GrsA et GrsB catalysent alors la formation d'un second pentapeptide. La libération de la gramycidine n'a lieu qu'après formation d'une liaison covalente entre les deux monomères par le module TE, ce qui aboutit au décapeptide cyclique (Shaw-Reid *et al.*, 1999). De même, l'entérobactine est synthétisée par une NRPS à deux modules catalysant la condensation du di-hydrobenzoate et de la sérine. La macrolactonisation de trois monomères DHB-sérine par le domaine TE aboutit à la formation du sidérophore trimérique actif (Gehring *et al.*, 1998). Les NRPS ayant ce mode de fonctionnement itératif sont appelées NRPS de type B (Mootz *et al.*, 2002). Enfin, il existe un troisième type de NRPS dont la structure diverge du modèle (A-PCP-C)_n, et qui incorpore des substrats qui ne sont pas covalentement liés au domaine PCP. C'est notamment le cas pour la bléomycine synthétase dont un des modules présente un domaine A non fonctionnel qui est complété en trans par un autre module (Du *et al.*, 2003). Nous verrons que le modèle de biosynthèse de l'albicidine présente des particularités de ce type. De même, la vibriobactine est synthétisée par une NRPS présentant deux domaines de cyclisation consécutifs suivis par un module (A-C-PCP-C) et qui ne permet pas de prévoir que la molécule résulte de la condensation de quatre intermédiaires de synthèse par un domaine de condensation présentant deux activités catalytiques différentes (Marshall *et al.*, 2002).

Ces NRPS de type C, dont le mode de fonctionnement est compliqué, confirment l'importance d'entreprendre une double approche dans la caractérisation d'un peptide non ribosomal. Ainsi, la caractérisation de la structure chimique de la molécule d'une part, et la caractérisation de la structure génétique de la NRPS la synthétisant, d'autre part, permettent de façon complémentaire d'expliquer des particularités structurales de la molécule et de l'enzyme qui la synthétise.

Les NRPS présentent donc un large avantage par rapport à la synthèse peptidique classique pour l'incorporation de substrats non protéinogéniques, contribuant

largement à la diversité structurale des produits que ces mégasynthétases produisent. Grâce aux travaux de biochimie structurale qui ont révélé le fonctionnement des différents domaines, aux études biochimiques des divers produits et aux données de séquence des différents NRPS, le mode d'action de ces enzymes complexes est peu à peu élucidé. Cependant, il semble que la variabilité structurale des différentes NRPS soit également le reflet d'une variabilité de mode d'action, ce qui souligne l'importance d'approches complémentaires biochimiques, génétiques et structurales dans l'étude des peptides non ribosomiaux.

1.2 Les PKS

Les polycétide synthases (PKS pour polyketide synthases) partagent de nombreuses caractéristiques avec les NRPS quant à la logique de leur fonctionnement et leur structure en mégaprotéines modulaires (Cane & Walsh, 1999). Les PKS ressemblent également beaucoup aux FAS ("fatty acyl synthases"), qui sont les enzymes responsables de la biosynthèse des acides gras, tant du point de vue mécanistique qu'architectural. Les PKS dérivent assez probablement des FAS d'un point de vue évolutif.

1.2.1 *Structure et fonctionnement des PKS*

La biosynthèse d'un polycétide requiert au minimum trois domaines organisés en module à l'image des NRPS. Le domaine AT (pour acyl transférase) est responsable de la sélection et de l'activation d'un substrat, une molécule d'acyle sous la forme d'une molécule de coenzyme A acylée (méthyl-, éthyl-, malonyl-, propionyl-, éthyl-malonyl Coenzyme A, etc.). Le domaine AT transfère le substrat sur le bras Ppant du domaine Holo-ACP adjacent. Le substrat est alors transloqué sur un résidu sérine du site actif du domaine cétoynthase (KS). Le dérivé acyl-CoA porté par le module adjacent est alors décarboxylé. Il en résulte un groupement nucléophile qui va attaquer le polycétide en cours de synthèse lié au module KS. L'acyl de départ (généralement un propionyl-CoA) est alors transféré sur le substrat suivant, et ainsi de suite jusqu'à ce que le produit final atteigne le dernier module et soit libéré par une réaction de macrolactonisation catalysée par le domaine TE distal. Cette dernière réaction aboutit à la régénération de la PKS qui peut alors catalyser un nouveau cycle de biosynthèse (Figure 31). Comme les NRPS, les PKS peuvent également présenter un certain nombre de domaines annexes, responsables de

réactions de réduction successives du polycétide en cours de synthèse. Ces domaines sont appelés KR (β -kétoreductase), DH (déshydratase) et ER (énoyl réductase). Leur présence ou absence détermine respectivement si la biosynthèse du polycétide s'arrête après que la β -cétone néosynthétisée soit réduite en groupement hydroxy, après qu'une molécule d'eau soit éliminée (résultant en la formation d'une double liaison), ou après qu'une réduction complète de l'acyle ait eu lieu.

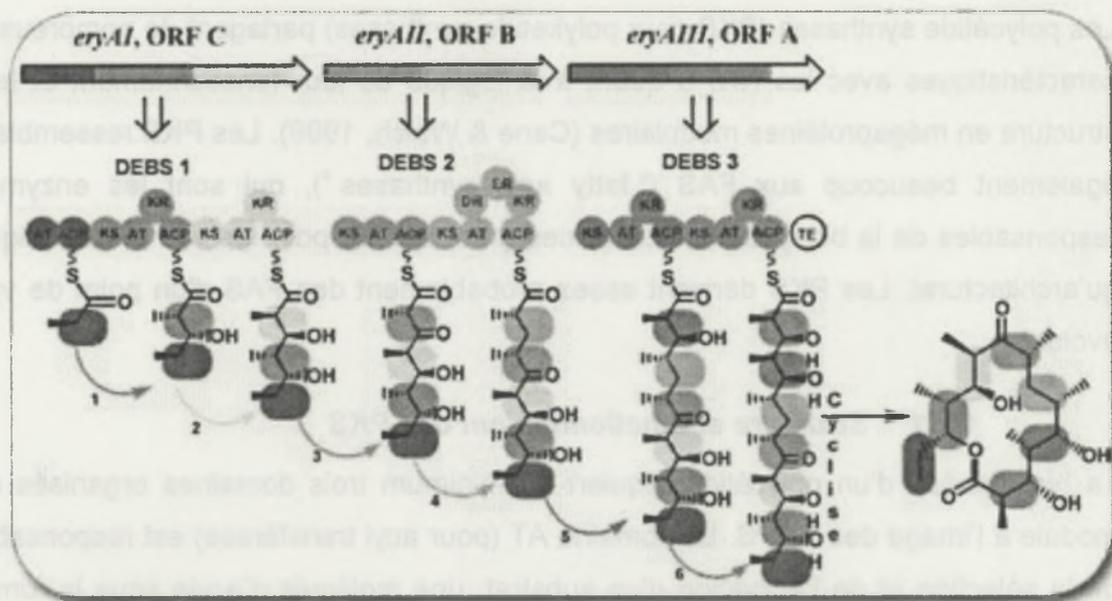


Figure 31 : Organisation en domaines de la 6-déoxyerythronoline synthétase. (D'après Staunton, 2001).

1.2.1.1 Domaine Acyle Transférèse (AT)

La première étape d'assemblage d'un polycétide est le transfert d'un substrat activé au domaine ACP correspondant. Cette étape est catalysée par un module particulier, le module d'initiation, qui est composé d'un domaine AT et d'un domaine ACP (*i.e.* domaine KS est absent). L'initiation diffère selon le type de PKS (modulaire ou itérative, voir section 1.2.2). Pour les PKS de type I, la biosynthèse est initiée de trois manières : soit le domaine AT du premier module transfère un précurseur d'acétyl coenzyme A tel que le propionyl-CoA sur le domaine ACP, soit ce domaine

Rapport gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

décarboxyle un malonyl-CoA ou un méthyl malonyl-CoA, soit encore il active directement un acide carboxylique intracellulaire (Khosla *et al.*, 1999). Pour les PKS de type II, le module d'initiation greffe un acétate sur le premier module ACP. Cet acétate a la particularité de provenir de la décarboxylation oxydative d'un malonyl-CoA dont il résultera un intermédiaire de type acétyl-S-KS (Bisang *et al.*, 1999). Cependant, de nombreuses exceptions existent quant à la nature du substrat responsable de l'initiation de la biosynthèse des polycétides (cf. compilation de Moore & Hertweck, 2002). Cette variabilité est en partie responsable de l'énorme diversité des polycétides et permet d'envisager la synthèse d'analogues de polycétides naturels par ingénierie métabolique. Les autres domaines AT (i.e. situés en aval du module d'initiation) fonctionnent selon le même mode que le domaine AT du module d'initiation. Du point de vue de la spécificité, bien que chaque domaine AT spécifie un substrat bien défini, il n'a pas encore été possible de définir un code permettant de prévoir la nature du substrat incorporé en fonction de la séquence nucléotidique du domaine AT (Liou & Khosla, 2004). La structure tridimensionnelle d'un domaine AT d'une PKS multimodulaire n'a pas été reportée à ce jour, vraisemblablement à cause de soucis d'expression dans *E. coli*. Deux domaines AT de FAS de type II (itérative) ont cependant été cristallisés (*E. coli* et *S. coelicolor*-Keatinge-Clay *et al.*, 2003). Cette dernière étant recrutée par de nombreuses PKS de type II, le site actif du domaine AT ainsi que trois acides aminés essentiels dans la liaison au substrat ont pu être définis. Ces travaux devraient à brève échéance permettre de définir un code de prévision des substrats activés par les domaines AT.

1.2.1.2 Domaine " Acyl Carrier Protein " (ACP)

Ce domaine est initialement synthétisé sous forme d'holo ACP et subit une modification post traductionnelle par une phosphopanthéthéinyl transférase qui est responsable de la liaison d'un groupement Ppant dérivé du Coenzyme A sur l'holoACP. Comme pour le domaine PCP, le domaine ACP joue le rôle de " carrier protein " et permet le transfert du polycétide en cours d'élongation d'un site catalytique à l'autre.

1.2.1.3 Domaine Cétosynthase KS

La stratégie catalytique du domaine KS est bien caractérisée (Figure 32). C'est un mécanisme par étape : initialement, le groupement acyl porté par le domaine ACP en amont du domaine KS subit une attaque nucléophile de la part d'un résidu cystéine

conservé du domaine KS. Il en résulte un transfert du groupement acyl sur le domaine KS avec formation d'une nouvelle liaison thioester et libération du bras Ppant du module en amont. Le domaine KS catalyse alors la décarboxylation oxydative de l'aryl-CoA (généralement un méthyl-malonyl-CoA) situé sur le domaine ACP du module en aval. Il en résulte la formation d'un carbanion qui attaque la liaison thioester précédemment formée entre le groupement acyl situé en amont et le résidu cystéine du site actif du domaine KS. Le produit de cette réaction se trouve par conséquent transféré sur le bras Ppant du module aval où il peut subir un autre cycle d'élongation (Keating & Walsh, 1999).

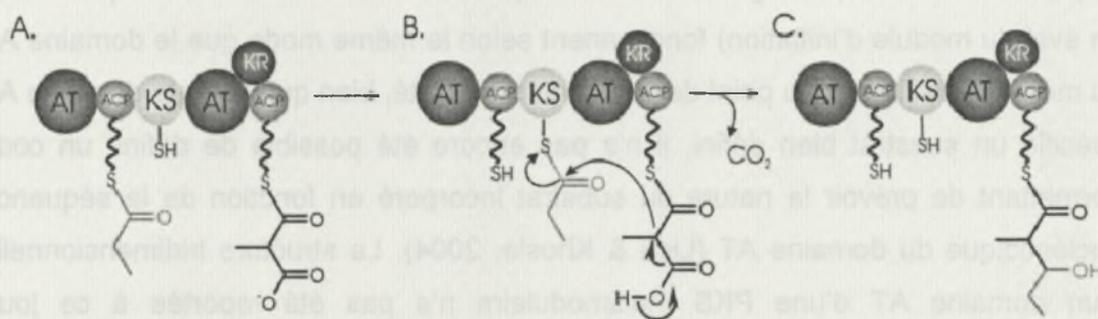


Figure 32 : Mécanisme de formation de la liaison C-C catalysée par un module KS d'une PKS (Finking & Marahiel, 2004)

1.2.1.4 Domaines annexes

Des modifications du squelette de la chaîne polycétidique sont catalysées durant les cycles d'élongation : une, deux, voire trois étapes de réduction peuvent avoir lieu en fonction de l'insertion de domaines cétoréductase (KR), déshydratase (DH) et énoyl réductase (ER) au sein d'un module donné. L'intermédiaire de synthèse peut alors subir une réduction allant jusqu'à un solde net de quatre électrons du β -cétoacyl jusqu'au méthylène. L'absence ou l'inactivation d'un ou plusieurs domaines résulte en l'arrêt de la cascade de réductions au niveau de l'intermédiaire β -cétoacyl, β -hydroxy, ou α - β insaturé, respectivement.

1.2.1.5 Domaine Thioestérase (TE)

Une fois que l'ensemble des cycles d'élongation a été effectué, le polycétide en cours de synthèse se retrouve covalentement lié au domaine ACP du dernier module (du côté carboxyterminal de la PKS) d'où il doit être libéré. La libération du polycétide

est catalysée par le module thioestérase (TE). Ce domaine TE transfère le polycétide porté par le bras Ppant du dernier domaine ACP vers un résidu sérine du site actif du module TE. Il résulte de cette attaque nucléophile une conversion du thioester acyl-S-ACP en oxoester acyl-O-TE. Le polycétide est alors libéré du domaine TE soit par hydrolyse (ce qui libère un polycétide linéaire), soit par une capture nucléophile intramoléculaire aboutissant à une macrolactonisation du polycétide libéré. La question de la spécificité du domaine TE a été étudiée pour la DEBS (6-déoxyerythronolide B, le polycétide non glycosylé précurseur de l'érythromycine) par transfert du domaine TE en amont de sa position naturelle et obtention de polycétides macrolactonisés tronqués (Kao *et al.*, 1995). En revanche, ce même domaine TE de la DEBS, utilisé en trans ne permet pas de macrolactoniser un intermédiaire de synthèse. Ce résultat suggère l'existence d'interactions spécifiques entre domaines conduisant à la macrolactonisation. Enfin, certains systèmes de PKS contiennent un domaine TE supplémentaire sur un polypeptide distinct de la PKS. Son rôle serait de maintenir les PKS sous une forme active en hydrolysant les complexes ACP-acyl incorrectement initiés ou en libérant certains domaines ACP sur lesquels le polycétide serait bloqué (Butler *et al.*, 1999).

1.2.1.6 Les modifications post PKS

La structure du squelette carboné des polycétides subit généralement des modifications supplémentaires après libération du polycétide. Ces modifications sont le plus souvent responsables de l'activité biologique des polycétides. Le squelette carboné peut subir une ou plusieurs réactions d'oxydation qui introduiront un groupement hydroxy ou carboxy dans la molécule. Le squelette peut également être méthylé au niveau d'un carbone, mais également d'un azote ou d'un oxygène. Enfin, le polycétide peut subir une glycosylation, une alkylation, ou encore une acylation. L'ensemble de ces réactions est catalysé par des enzymes codées par des gènes appartenant généralement au même groupement que ceux codant pour les PKS. Cette caractéristique accentue encore l'énorme variabilité des structures de polycétides et la modification artificielle de la structure des polycétides naturels par manipulation de ces enzymes de modification a été envisagée (Rix *et al.*, 2002).

1.2.2 Trois classes de PKS

Comme les NRPS, les PKS sont classées en trois types en fonction de leur mécanisme de fonctionnement. Les PKS de type I sont des enzymes

multifonctionnelles organisées en modules comportant chacun une série d'activités enzymatiques distinctes chargées de catalyser un cycle d'élongation du polycétide en cours de synthèse et fonctionnant de manière non itérative. L'exemple le plus étudié de PKS de type I est la DEBS (6-déhydroerythronolide B synthase) qui catalyse la biosynthèse du 6-déhydroerythronolide B, un polycétide réduit précurseur de l'erythromycine A. Les PKS de type II sont des complexes multienzymatiques composés d'une série unique de domaines ayant une activité enzymatique fonctionnant sur un mode itératif. Ces enzymes catalysent généralement la biosynthèse de polycétides aromatiques polycycliques tels que la tetracénomycine (Shen, 2000). Enfin, les PKS de type III ou PKS de type Chalcone synthase sont des enzymes homodimériques qui fonctionnent essentiellement sur un mode itératif à l'image de la RppA synthase qui catalyse la synthèse de flavoline, un polycétide aromatique bicyclique (Moore & Hopke, 2001). Les PKS de type I et II activent l'acyl coenzyme A incorporé au polycétide au moyen d'un ACP qui est également responsable de l'orientation du polycétide en cours de biosynthèse. Inversement, les PKS de type III agissent directement sur le substrat acyl-CoA indépendamment des ACP. Enfin, malgré des différences de structure et de mécanisme, l'ensemble de ces PKS fonctionne par condensation décarboxylative séquentielle des précurseurs de type acyl-CoA pour synthétiser un polycétide par formation de liaisons C-C catalysées par un domaine KS appartenant à module (type I) ou à une sous unité (type II & III). Enfin, il est à noter que cette classification a été quelque peu remise en cause par Ben Shen (Shen, 2000) qui a souligné l'immense diversité de mécanismes afférents aux PKS.

1.3 Les hybrides polycétide-peptide non ribosomal

Les similitudes de structure et de mécanisme de catalyse des PKS et des NRPS suggèrent que des molécules hybrides peuvent exister. Les hybrides polycétide-peptide non ribosomal font référence à des métabolites secondaires synthétisés à partir d'acides carboxyliques et d'acides aminés. Il existe deux classes d'hybrides selon que leur biosynthèse nécessite ou non une interaction physique entre les PKS et NRPS qui les synthétisent.

1.3.1 Biosynthèse sans interaction entre PKS et NRPS

Les hybrides polycétides-peptide non ribosomal (PK/NRP) appartenant à cette classe peuvent être synthétisés selon différents mécanismes qui sont brièvement décrits ci dessous.

- i) Un polycétide et un peptide non ribosomal sont synthétisés de manière concomitante par deux mégasynthèses indépendantes (une PKS et une NRPS respectivement). Les deux produits libérés par les domaines TE des deux mégasynthèses sont ensuite couplés par une enzyme de type ligase. C'est ce type de mécanisme qui conduit à la formation de la coronatine à partir d'acide coronamique (NRP) et d'acide coronafacique (PK) (cf. chapitre I 4.2.1);
- ii) Un polycétide (i.e. une chaîne acyl) est greffé sur la fonction amine du premier acide aminé activé par le premier module NRPS, grâce à un domaine C particulier qui est normalement absent du module NRPS initiateur. Les lipopeptides tels que les syringomycines ou les surfactines sont synthétisés par ce type de mécanisme (cf. chapitre I 4.2.2).
- iii) Un polycétide covalentement lié au dernier domaine PCP d'une PKS est converti en acide β -aminé par un domaine amine transférase, et l'acide aminé ainsi obtenu est alors pris en charge par une NRPS. Ce type de mécanisme est mis en oeuvre lors de la biosynthèse des lipopeptides microcystine par *Microcystis aeruginosa* (Tillett *et al.*, 2000) et mycosubtiline par *Bacillus subtilis* (Duitman *et al.*, 1999).
- iv) Un polycétide est libéré par le module TE de la PKS l'ayant synthétisé, puis est converti en acide α -aminé libre par une aminotransférase. Il est ensuite pris en charge par le module d'initiation d'une NRPS. La biosynthèse de la cyclosporine (Offenzeller *et al.*, 1996) constitue un exemple de ce type de mécanisme de synthèse d'hybride polycétide-peptide non ribosomal sans interaction entre PKS et NRPS.

1.3.2 Biosynthèse avec interaction entre PKS et NRPS

Dans ce type de mécanisme de biosynthèse, un peptide non ribosomal en cours d'élongation est directement pris en charge par un module PKS qui catalyse l'incorporation d'un acyl (antibiotique TA1 par *Myxococcus xanthus*, Paitan *et al.*, 1999 ; 2000). Réciproquement, un polycétide en cours d'élongation peut être pris en

charge par un module NRPS qui poursuivra l'élongation de l'hybride (rapamycine par *Streptomyces hygroscopicus*, König *et al.*, 1997). Enfin, la biosynthèse de la majorité des métabolites hybrides est initiée par un ou plusieurs modules d'un type, puis poursuivie par un module d'un autre type et terminée par un ou plusieurs modules du type initial. Ainsi, l'épothilone est un hybride PK-NRP-PK (*Sorangium cellulosum*, Tang *et al.*, 2000a) et bléomycine un hybride NRP-PK-NRP (*Streptomyces verticillum*, Du *et al.*, 2000).

D'un point de vue biochimique, dans un système hybride NRPS-PKS, c'est le domaine KS qui catalysera la formation d'une liaison C-C. Le polypeptide en cours d'élongation (sous la forme d'un peptidyl-S-PCP) sera transféré de la NRPS située en amont, vers le résidu Cystéine du site actif du module KS de la PKS en aval. Le peptidyl-S-KS ainsi formé subira une réaction de condensation décarboxylative avec le malonyl-S-ACP porté par le module PKS, résultant en l'élongation de la chaîne peptidique avec un acide carboxylique court. Inversement, dans un hybride PKS-NRPS, c'est le domaine C de la NRPS qui est responsable de la formation de la liaison C-N. Ce domaine catalyse une substitution nucléophile entre le groupement acyl du polycétide en cours d'élongation (sous la forme d'un acyl-S-ACP) avec le groupement amine de l'aminoacyl-S-PCP du module NRPS en aval. Il en résulte l'élongation de la chaîne polycétidique avec un acide aminé. Ces observations mécanistiques permettent d'affirmer que les domaines critiques pour la communication inter modulaire sont les domaines KS et PCP dans une interaction PKS-NRPS et que ce sont les interactions entre domaines ACP et C qui sont critiques dans un hybride NRPS-PKS (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001). Khosla et ses collaborateurs (Gokhale *et al.*, 1999) ont démontré l'existence de séquences peptidiques particulières (17 à 21 résidus peu conservés à l'exception d'un résidu Proline) assurant la liaison entre différentes PKS impliquées dans le biosynthèse de l'érythromycine (Gokhale *et al.*, 1999; Gokhale & Khosla, 2000). De même l'extrémité carboxy-terminale (domaine ACP) du dernier module des PKS ainsi que l'extrémité amino-terminale (domaine C) du premier module des NRPS impliquées dans un hybride PKS-NRPS présentent un linker de taille variable (de 23 à 76 résidus pour le domaine ACP et de 25 à 54 résidus pour le domaine C) riche en résidus acides (domaine ACP) ou basiques (domaine C) et hydrophile. Le rôle de cette structure pourrait être la reconnaissance protéine-protéine entre les deux mégasynthèses (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001). Pour les hybrides NRPS-PKS, le

domaine PCP ne semble pas présenter de différence par rapport aux autres PCP, alors que le domaine KS présente des caractéristiques uniques par rapport aux autres domaines KS. Les résidus clés du site catalytique demeurent bien conservés, mais les résidus correspondant aux résidus impliqués dans les interactions avec le substrat et entre les monomères de la " β cétoacyl-acyl carrier protein synthase II ", une " fatty acyl synthase " d'*E. coli* divergent, cette caractéristique semble indiquer qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'hybridation fonctionnelle avec la NRPS en aval (Du *et al.*, 2001; Du & Shen, 2001).

1.4 Organisation génétique des PKS et NRPS

La vaste majorité des gènes codant pour des PKS et des NRPS séquencés sont organisés en groupements de gènes (Cane, 1997). Ces derniers rassemblent le ou les gènes codant pour les mégasynthèses, mais aussi les gènes codant pour la biosynthèse des substrats de ces mégasynthèses, les gènes codant, le cas échéant, pour la glycosylation des polycétides et peptides non ribosomiaux (en particulier sucres et amino-sucres greffés sur le squelette polycétidique), et les gènes codant pour les protéines intervenant dans la régulation de la biosynthèse et dans l'export du métabolite. Cependant, ils contiennent surtout les gènes codant pour les systèmes assurant la protection de l'organisme producteur contre l'antibiotique qu'il produit (Rawlings, 2001). En revanche, la phosphopantéthéinyl transférase, responsable des modifications post traductionnelles des PKS et des NRPS, bien que généralement spécifique des modules qu'elle modifie, n'est pas intégrée à ces groupements. On la retrouve généralement dans un endroit différent du génome (Walsh, 1997).

2 Résultats

Le séquençage de la plus grande région génomique impliquée dans la biosynthèse de l'albicidine (XALB1) a permis de mettre en évidence vingt ORFs. La comparaison de la séquence obtenue avec celle des gènes impliqués dans d'autres systèmes de biosynthèse d'antibiotiques a permis d'attribuer à chacune de ces ORFs une fonction et de proposer un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une composition chimique et une structure théoriques du squelette de la molécule. Les études de

complémentation ont montré que trois de ces ORFs (*albl*, *albIV* et *albIX*) sont impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. Ces trois ORFs codent pour des polycétide synthétases ou des peptides synthétases non ribosomales. Quinze autres ORF de la région XALB1 sont potentiellement impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. Le séquençage de la région XALB2 a permis de mettre en évidence une seule ORF (*albXXI*) codant pour une phosphopanthéinyl transférase. Ces résultats ont conduit à la publication d'un article dans *Molecular Plant-Microbe interactions*. Cet article est présenté ci- après.

Rapport-Gratuit.com

1.4 Organisation des gènes *PKS* et *NRPS*

La vaste majorité des gènes codant pour les PKS et des NRPS séparent sont organisés en groupements de gènes (SST) Ces derniers rassemblent la ou les gènes codant pour les séquences de polyketide synthase et les gènes codant pour la biosynthèse des unités de ces mégasynthétases codant le cas échéant, pour la glycosylation des polycétides et pour la formation de rhodanols (en particulier avec des amino-acides greffés sur le squelette aliphatique) et les gènes codant pour les protéines intervenant dans la régulation de biosynthèse et dans l'export du métabolite. Cependant, ils contiennent aussi des gènes codant pour les enzymes assurant la protection de l'organisme producteur contre l'antibiotique qu'il produit (Rawling, 2001). En revanche, le projet génomique n'a pas permis de répondre des modifications post-transcriptionnelles des PKS et NRPS, bien que généralement spécifiques des modules qu'ils modifient, n'est pas liée à ces groupements. On se réfère généralement dans un autre chapitre à ce sujet (Vivien, 1997).

2. Résultats

Le séquençage de la plus grande région génomique annotée dans le génome de l'actinobactérie (*XALB1*) a permis de mettre en évidence vingt ORFs. La comparaison de la séquence connue avec celle des gènes impliqués dans l'ajout d'unités de polyketides à l'antibiotique a permis d'attribuer à chacun de ces ORFs une fonction et de proposer un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une comparaison de son squelette tricyclique au squelette de la mévalonate. Les résultats

Albicidin Pathotoxin Produced by *Xanthomonas albilineans* Is Encoded by Three Large PKS and NRPS Genes Present in a Gene Cluster Also Containing Several Putative Modifying, Regulatory, and Resistance Genes

Monique Royer,¹ Laurent Costet,¹ Eric Vivien,¹ Martine Bes,¹ Arnaud Cousin,¹ Anne Damais,¹ Isabelle Pieretti,¹ Alexandre Savin,¹ Sandrine Megessier,¹ Magali Viard,¹ Roger Frutos,¹ Dean W. Gabriel,² and Philippe C. Rott¹

¹UMR 385 CIRAD/ENSAM/INRA Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France; ²Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville 32611, U.S.A.

Submitted 16 May 2003. Accepted 21 November 2003.

Xanthomonas albilineans, which causes leaf scald disease of sugarcane, produces a highly potent pathotoxin called albicidin. We report here sequencing and homology analysis of the major gene cluster, XALB1 (55,839 bp), and a second, smaller region, XALB2 (2,986 bp), involved in albicidin biosynthesis. XALB1 contains 20 open reading frames, including i) three large genes with a modular architecture characteristic of polyketide synthases (PKSs) and nonribosomal peptide synthases (NRPSs) and ii) several putative modifying, regulatory, and resistance genes. Sequencing and complementation studies of six albicidin-defective mutants enabled us to confirm the involvement of the three PKS and NRPS genes encoded by XALB1 in albicidin production. XALB2 contains only one gene that is required for post-translational activation of PKS and NRPS enzymes, confirming the involvement of these enzymes in albicidin biosynthesis. In silico analysis of these three PKS or NRPS enzymes allowed us to propose a model for the albicidin backbone assembly and to gain insight into the structural features of this pathotoxin. This is the first description of a complete mixed PKS–NRPS gene cluster for toxin production in the genus *Xanthomonas*.

Additional keyword: antibiotic.

Xanthomonas albilineans is a systemic, xylem-invading pathogen that causes leaf scald disease of sugarcane (interspecific hybrids of *Saccharum* spp.) (Ricaud and Ryan 1989; Rott and Davis 2000). Leaf scald symptoms include chlorosis, necrosis, rapid wilting, and plant death. Chlorosis-inducing strains of the pathogen produce several toxic compounds. The major toxic component, named albicidin, inhibits chloroplast DNA replication, resulting in blocked chloroplast differentiation and chlorotic leaf streaks that are characteristic of the disease (Birch and Patil 1983, 1985b, 1987a,b). Several studies established that albicidin plays a key role in pathogenesis and especially in the development of disease symptoms (Birch

2001; Wall and Birch 1997; Zhang and Birch 1997; Zhang et al. 1999). Additionally, albicidin inhibits prokaryotic DNA replication and is bactericidal to a range of gram-positive and gram-negative bacteria (Birch and Patil 1985a). Therefore, albicidin also is of interest as a potential clinical antibiotic (Birch and Patil 1985a).

Low yields of albicidin production by *X. albilineans* (0.2 mg of purified toxin per liter of culture) (Birch and Patil 1985b) have slowed studies into the chemical structure of the toxin, into the production of albicidin during disease progress, and into its potential therapeutic applications. Although the chemical structure of albicidin remains unknown, the following chemical characteristics were determined with *X. albilineans* strain LS2 from Hawaii (Birch and Patil 1985a,b): i) partial characterization of albicidin obtained by proton and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy suggested that the compound has several aromatic rings and approximately 38 carbon atoms; ii) analyses by mass spectroscopy indicated that the molecular weight of albicidin is approximately 842 and that the compound contains at least one carboxyl (COOH) group; iii) albicidin is soluble in methanol, tetrahydrofuran, dimethyl sulfoxide, and 95% acetone, sparingly soluble in water and acetonitrile, and essentially insoluble in less polar solvents; iv) spot tests with common spray reagents (Stahl 1969) gave reactions typical of acid and phenol groups; and v) inhibitory activity of albicidin was undiminished after 3 h at 37°C with pronase at 50 µg/ml⁻¹.

Two similar mutagenesis and complementation studies have been conducted to identify the genetic basis of albicidin production in *X. albilineans* strains isolated in two different geographical locations, Queensland and Florida. One study with *X. albilineans* strain LS155 from Queensland revealed that genes for albicidin biosynthesis and resistance span at least 69 kb (Wall and Birch 1997). Subsequently, three genes required for albicidin biosynthesis were identified, cloned, and sequenced from two Queensland strains of *X. albilineans* (LS155 and Xa13): *xabA*, *xabB*, and *xabC*. The *xabB* gene encodes a large protein with a modular architecture indicative of a multifunctional polyketide synthase (PKS) linked to a nonribosomal peptide synthase (NRPS) (Huang et al. 2001). The *xabC* gene, located immediately downstream from *xabB*, en-

Corresponding author: Philippe Rott; Telephone: (33) 4 99 62 48 34; Fax: (33) 4 99 62 48 48; E-mail: philippe.rott@cirad.fr

codes an S-adenosyl-L-methionine-dependent *O*-methyltransferase (Huang et al. 2000a). The *xabA* gene, located in another region of the genome, encodes a phosphopantetheinyl transferase required for post-translational activation of PKS and NRPS enzymes (Huang et al. 2000b).

A second study with *X. albilineans* strain Xa23R1 from Florida revealed that at least two gene clusters, one spanning more than 48 kb, are involved in albicidin production (Rott et al. 1996). This conclusion was based on the following data: i) 50 Xa23R1 mutants defective in albicidin production were isolated; ii) two overlapping DNA inserts from an Xa23R1 genomic library of approximately 47 and 41 kb from clones pALB540 and pALB571, respectively, complemented 45 of the mutants; and iii) 5 remaining mutants were not complemented by either pALB540 or pALB571.

NRPS and PKS enzymes are large, multifunctional enzymes organized into modules individually responsible for one elongation step of the growing polypeptide or polyketide chain (Cane and Walsh 1999). An NRPS module consists of three domains: the adenylation domain (A) that activates an amino acid monomer, a peptidyl carrier protein (PCP) that tethers the growing polypeptide, and a condensation domain (C) that catalyses the formation of the peptide bond between the activated amino acid and the growing polypeptide. Similarly, a PKS module consists of three domains: the acyltransferase domain (AT) that activates an acyl-CoA monomer; the acyl carrier protein domain (ACP) that tethers the growing polyketide, and the ketosynthase domain (KS) that catalyses the formation of a bond between the activated monomer and the

growing polyketide. In addition to the basic subset of core domains, each NRPS or PKS system also has i) a domain responsible for the initiation of chain assembly by loading of a starter unit onto the first PKS/NRPS module and ii) a chain-terminating thioesterase (TE) domain, most often found fused to the last module, that is responsible for detachment of the mature polyketide or polypeptide chain (Cane and Walsh 1999). The adenylation and acyltransferase domains are gatekeepers for the biosynthesis of the polypeptide and the polyketide, respectively, because of strict and high specificity for their cognate substrates.

The NRPS substrate binding pockets are so highly specific for their substrates that predictive models based upon consensus signature motifs for known substrates have been determined. Based on sequence analysis of 160 known prokaryotic A domains and on the crystal structure of the substrate binding pocket of the phenylalanine A domain of gramicidin S synthase from *Brevibacillus brevis*, two models have been published to predict the amino acid substrate which is recognized by an unknown NRPS A domain (Challis et al. 2000; Stachelhaus et al. 1999). The model defined by Stachelhaus and associates (1999) identifies a group of 10 residues within pockets that encode amino acid specificity. The model defined by Challis and associates (2000) identifies eight of the same residues defined by Stachelhaus and associates (1999), excluding the tenth residue, which is involved in binding the carboxyl group of an amino acid and the ninth residue. In addition, based on the crystal structure of an aryl acid-activating domain, May and associates (2002) identified a group of 10 residues within

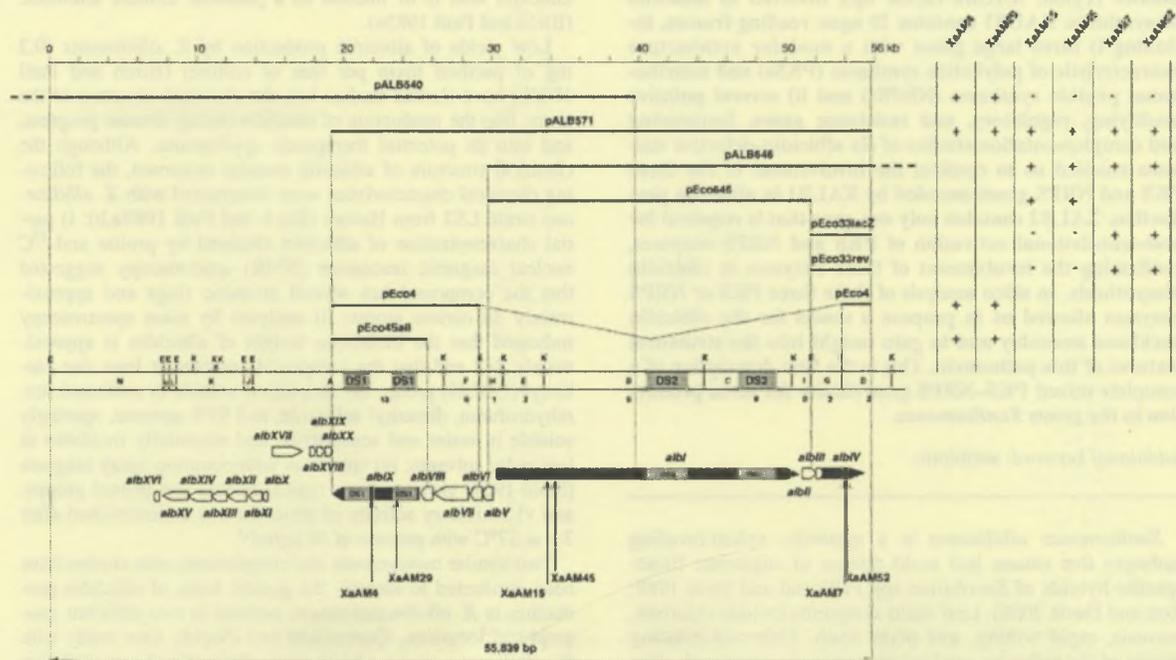


Fig. 1. Physical map and genetic organization of the DNA region containing the gene cluster XALB1 involved in albicidin production. Restriction map: E and K are restriction sites for *EcoRI* and *KpnI*, respectively. Rectangular boxes represent DNA fragments labeled A through N. The number below each rectangular box is the number of the *Tn5-gusA* insertion sites previously located in each DNA fragment in 39 albicidin-defective mutants complemented by pALB571 (Rott et al. 1996). The DNA inserts carried by plasmids pALB540, pALB571, pALB646, pEco646, pEco33lacZ, pEco33rev, pEco4, and pEco4Sall are represented by bars above the physical map. The location and direction of the 20 open reading frames (ORFs) identified in the XALB1 gene cluster are shown by thick arrows. The three polyketide synthase and nonribosomal peptide synthase genes are shown by black and thick arrows. Position of *Tn5* insertional sites of six albicidin-defective mutants determined by sequencing are indicated by vertical arrows. Shaded regions in the physical map and white boxes in ORFs *albI* and *albIX* represent the two internal duplicated DNA regions of XALB1 designated DS1 and DS2. Results of complementation studies are summarized in the table at the right of the figure; + = restoration of albicidin production and - = no restoration of albicidin production. All experiments were performed at least in duplicate with 2 to 12 exconjugants.

pockets that encode aryl acid specificity. A combination of different modules, their order, and the arrangement of the different auxiliary domains can be used to successfully predict the final structure of the synthesized polyketide or polypeptide.

We report here DNA sequencing of the major gene cluster XALB1 present in the two overlapping DNA inserts of clones pALB540 and pALB571. Reading frame analysis and homology analysis revealed the presence in XALB1 of 20 open reading frames (ORFs) designated *albI* to *albXX*. Complementation studies of six mutants defective in albicidin production

enabled us to confirm the involvement in albicidin production of three of these genes (*albI*, *albIV*, and *albIX*) which encode three large PKS and NRPS enzymes. Alignment of these three PKS or NRPS enzymes encoded by XALB1 allowed us to propose a model for the albicidin backbone assembly and to partially predict the structure of albicidin. We also report cloning and DNA sequencing of a second region of the genome involved in albicidin production (XALB2) which contains only one gene (*albXXI*) which is 99% identical to *xabA* and which is required for activation of PKS and NRPS enzymes.

Table 1. Bacterial strains, plasmids, and DNA fragment used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- <i>f80dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (τ_K^- m κ^+) supE44 thi-1 <i>gyrA96 relA1</i>	Gibco-BRL
<i>Xanthomonas albilineans</i>		
Xa23	Wild type from sugarcane (Florida)	Rott et al. 1996
Xa23R1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xa23	Rott et al. 1996
8 XaAM strains	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> , Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	Rott et al. 1996
LS156	LS155- <i>xabA</i> ::Rn5, Km ^r , St ^r , Tox ⁻	Huang et al. 2000b
LS156R1	Spontaneous Rif ^r derivative of LS156	Rott et al. 1996
LS157	LS155- <i>xabB</i> ::Tn5- <i>xabB</i> , Km ^r , St ^r , Tox ⁻	Huang et al. 2001
LS157R1	Spontaneous Rif ^r derivative of LS157	Rott et al. 1996
Plasmids		
pBR325	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	Gibco-BRL
pBCKS(+)	Cm ^r	Stratagene
pBluescript II KS(+)	Ap ^r	Stratagene
pRK2073	pRK2013 derivative, Km ^r (<i>nptII</i> :Tn7), Sp ^r , Tra ⁺ , helper plasmid	Leong et al. 1982
pUFR043	IncW Mob ⁺ <i>LacZ</i> α , Gm ^r , Km ^r , Cos	De Feyter and Gabriel 1991
pALB540	47-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	Rott et al. 1996
pALB571	36.8-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	Rott et al. 1996
pAM15.1	24-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM15 in pBR325, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	Rott et al. 1996
pAM45.1	12-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM45 in pBR325, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	Rott et al. 1996
pALB646	37-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEco646	22-kb insert from pALB646 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEco4	9.9- and 2.2-kb inserts from pALB571 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEco4Sall	6.4-kb insert from pALB571 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEco33lacZ	4.1-kb insert from pALB571 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEco33rev	4.1-kb insert from pALB571 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pALB389	37-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pAC389.1	2.9-kb insert from pALB389 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pBC/A'	7.5-kb <i>KpnI</i> fragment carrying a part of fragment A from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/AF	15.2-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying fragments A and F from pALB540 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/B	11.0-kb <i>KpnI</i> fragment B from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/C	6.0-kb <i>KpnI</i> fragment C from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/E	2.8-kb <i>KpnI</i> fragment E from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/F	2.5-kb <i>KpnI-EcoRI</i> fragment F from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/G	1.9-kb <i>EcoRI</i> fragment G from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/I	1.4-kb <i>KpnI-EcoRI</i> fragment I from pALB571 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/J	0.6-kb <i>EcoRI</i> fragment J from pALB540 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/K	4.7-kb <i>EcoRI</i> fragment K from pALB540 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/L	0.4-kb <i>EcoRI</i> fragment L from pALB540 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pBC/N	7.7-kb <i>EcoRI</i> fragment N from pALB540 in pBCKS (+), Cm ^r	This study
pUFR043/D'	2.2-kb <i>EcoRI-Sau3A1</i> fragment carrying a part of fragment D from pALB571 in pUFR043	This study
pAM4	12-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM4 in pBluescript II KS (+), Km ^r , Ap ^r	This study
pAM7	6-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM7 in pBluescript II KS (+), Km ^r , Ap ^r	This study
pAM10	7-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM10 in pBluescript II KS (+), Km ^r , Ap ^r	This study
pAM29	10-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM29 in pBluescript II KS (+), Km ^r , Ap ^r	This study
pAM37	6-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM37 in pBR325, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	This study
pAM52	5-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM52 in pBluescript II KS (+), Km ^r , Ap ^r	This study
DNA fragment		
PR37	1.1-kb <i>HindIII-HindIII</i> from pAM37	This study

^a Ap^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Rif^r, Sp^r, St^r, and Tc^r = resistant to ampicillin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, rifampicin, spectinomycin, streptomycin and tetracycline, respectively. Tox⁻ = deficient in albicidin production. Tn5-*gusA*, Tn5-*uidA1* Km^r Tc^r, forms transcriptional fusions.

RESULTS

Sequencing of the double-stranded region from *X. albilineans* containing XALB1.

Both strands of a double-stranded region of 55,839 bp present in two overlapping DNA inserts of the clones pALB571 and pALB540 were sequenced (Fig. 1) (GenBank accession number AJ586576). This region, which complemented 45 of the 50 Xa23R1 mutants defective in albicidin production (Rott et al. 1996) (Table 1), contains the albicidin biosynthetic gene cluster XALB1.

Homology analysis of proteins potentially encoded by XALB1.

Among the ORFs identified from the sequenced XALB1 gene cluster, 20 ORFs, designated *albI* to *albXX*, potentially

encode proteins similar to proteins from the GenBank database (Fig. 1). They include i) three large genes, *albI*, *albIV*, and *albIX*, encoding PKS or NRPS modules; and ii) several putative modifying, regulatory, and resistance genes (Table 2). Three of them are very similar to genes previously isolated from *X. albilineans* and described as involved in albicidin biosynthesis or in albicidin resistance: i) *albI*, which is very similar to *xabB*, described as encoding a PKS-NRPS enzyme involved in albicidin biosynthesis (Huang et al. 2001); ii) *albII*, which is 100% identical to the *xabC* cistron, described downstream *xabB* as encoding a S-adenosyl-L-methionine *O*-methyltransferase involved in albicidin biosynthesis (Huang et al. 2000a); and iii) *albXIV*, which is 100% identical to *albF*, described in GenBank as encoding a putative albicidin efflux pump that confers high level of albicidin resistance in *Escherichia coli* (accession number AAL01877).

Table 2. Putative deduced functions of the open reading frames in the XALB1 gene cluster

Protein	No. of amino acids	Proposed function ^a	Sequence similarity (protein, origin)	Identity/similarity (%)	Consensus length	GenBank accession no.		
AlbI	6,879	Polyketide-peptide synthase						
		PKS modules	PKS domains					
		PKS-1	AL ACP1	XabB, <i>Xanthomonas albilineans</i>	100/100	730	AAK15074	
		PKS-2	KS1 KR ACP2 ACP3	XabB, <i>X. albilineans</i>	100/100	1,882	AAK15074	
		PKS-3	KS2 PCP1	XabB, <i>X. albilineans</i>	100/100	653	AAK15074	
		NRPS modules	NRPS domains					
		NRPS-1	C A PCP2	XabB, <i>X. albilineans</i>	99/99	1,046	AAK15074	
		NRPS-2	C A PCP3	NosA, <i>Nostoc</i> sp.	29/43	1,127	AAF15891	
		NRPS-3	C A PCP4	XabB, <i>X. albilineans</i>	95/96	1,044	AAK15074	
		NRPS-4	C	XabB, <i>X. albilineans</i>	100/100	468	AAK15074	
		NRPS-5	C	XabC, <i>X. albilineans</i>	100/100	343	AAK15075	
AlbII	343	<i>O</i> -methyltransferase	ComA, <i>Escherichia coli</i>	50/65	135	BAA15452		
AlbIII	167	Activation of alb genes transcription						
AlbIV	941	Peptide synthase						
		NRPS module	NRPS domains					
AlbV	239	NRPS-5	A PCP5	BA3, <i>Bacillus licheniformis</i>	43/60	441	AAC06348	
		<i>N. O</i> -acyltransferase	FechH, uncultured bacterium	24/40	123	AAM97301		
		No function (transposition)	IS transposase, <i>Yersinia pestis</i>	47/66	183	AAC82714		
AlbVI	286	<i>O</i> -methyltransferase	Thp, <i>X. albilineans</i>	100/100	239	Huang et al. 2000a		
			TcmP, <i>Pasteurella multocida</i>	28/49	132	AAK03406		
AlbVII	765	4-hydroxybenzoate CoA ligase	HbaA, <i>Rhodospseudomonas palustris</i>	31/48	492	AAA62604		
AlbVIII	330	Regulation	SyrP, <i>Pseudomonas syringae</i>	34/50	306	AAB63253		
AlbIX	1,959	Peptide synthase						
		NRPS modules	NRPS domains					
		NRPS-6	A PCP6	XabB, <i>X. albilineans</i>	47/61	608	AAK15074	
AlbX	83	Unknown	NRPS-7	C A PCP7	XabB, <i>X. albilineans</i>	46/61	1,110	AAK15074
			MbtH, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45/66	55	CAB08480		
AlbXI	315	Esterase	SyrC, <i>P. syringae</i>	24/42	93	AAA85161		
AlbXII	451	Unknown	BoxB, <i>Azoarcus evansii</i>	38/53	448	AAK00599		
AlbXIII	317	Unknown	Hp, <i>Caulobacter crescentus</i> ^b	29/41	296	AAK25001		
			AlbF, <i>X. albilineans</i>	100/100	496	AAL01877		
AlbXIV	496	Albicidin transporter						
AlbXV	584	Carbamoyl transferase	BlmD, <i>Streptomyces verticillus</i>	33/46	441	AAG02370		
			No function (transposition)	OrfA, <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	53/69	54	AAC03166	
AlbXVII	716	Para-amino benzoate synthase	PABA synthase, <i>S. griseus</i>	43/58	699	CAC22117		
AlbXVIII	137	4-amino-4-deoxychorismate lyase	ADCL, <i>P. aeruginosa</i>	43/61	105	AAG06352		
AlbXIX	200	Immunity against albicidin	McbG, <i>E. coli</i>	25/40	141	CAA30724		
AlbXX	202	4-hydroxybenzoate synthetase	UbiC, <i>E. coli</i>	26/40	161	CAA40681		

^a Nonribosomal peptide synthase (NRPS) and polyketide synthase (PKS) domains are abbreviated as follows: A = adenylation, ACP = acyl carrier protein, AL = acyl CoA ligase, C = condensation, KR = ketoreductase, KS = ketoacyl synthase, and PCP = peptidyl carrier protein. Underlined domain is likely inactive due to the lack of highly conserved motifs.

^b Hp = hypothetical protein.

Two large internal duplications, designated DS1 and DS2, are present in *albIX* and *albI* genes, respectively (Fig. 1). The two copies of the 1,736-bp DS1 duplicated sequence located in *albIX* differ by one nucleotide. The two copies of the 2,727-bp DS2 duplicated sequence located in *albI* differ by 30 nucleotides.

Identification of *albI*, *albIV*, and *albIX* mutants.

The Tn5-*gusA* insertion sites of 39 albicidin-defective mutants complemented by pALB571 previously were located in different *EcoRI* or *KpnI* DNA fragments of XALB1 by Southern blots (Rott et al. 1996) (Fig. 1, see number below each rectangular box). Further analyses revealed that the insertion sites of these 39 *Tox*⁻ mutants were located in *albI*, *albIV*, or *albIX*: i) the 20 insertions which previously were located in fragments E, B, or C were found to be internal to *albI*; ii) the 3 insertions which previously were located in fragment D were internal to *albIV*; iii) sequencing of the Tn5 insertion site of the two mutants located in fragment G revealed that they were located in *albIV*; iv) albicidin production was restored in the mutant located in fragment H by complementation with pEco646 (containing only *albI* and 825 bp of the 1,032 bp of *albII*) (Fig. 1), confirming that this mutant is located in *albI*; and v) the 13 insertions which previously were located in fragment A and which were complemented by pALB571 correspond, therefore, to *albIX* or *albVIII* mutants (most probably *albIX* mutants because *albIX* corresponds to 75% of the part of DNA fragment A present in pALB571).

Complementation analysis of six *albI*, *albIV*, or *albIX* mutants.

Further complementation studies were performed with the following six *X. albilineans* *Tox*⁻ mutants which contain a single Tn5 insertion each: two *albI* mutants, XaAM15 and XaAM45, located at position 33,443 and 34,229, respectively; two *albIV* mutants, XaAM7 and XaAM52, located at position 53,704 and 53,915, respectively; and two *albIX* mutants, XaAM4 and XaAM29, located at position 21,653 and 23,444, respectively (Fig. 1). Previous complementation

studies showed that XaAM7, XaAM15, XaAM45, and XaAM52 were complemented by pALB571 but not by pALB540; and that XaAM4 and XaAM29 were complemented by both cosmids (Rott et al. 1996).

The two *albI* mutants were complemented with cosmids pALB646 and pEco646. pALB646 contains a DNA insert of 41 kb cloned in reverse orientation of *lacZ* promoter and starts at base pair 29,699 of XALB1 (497 bp upstream from the TTG of *albI*). pALB646 contains *albI*, *albII*, *albIII*, and *albIV* and the 12-kb unsequenced DNA region downstream from XALB1. pEco646 contains *albI* and the first 825 bp of the 1,032 bp of *albII*. Transfer of pALB646 into XaAM15 and XaAM45 restored albicidin production, indicating that the promoter of *albI* is present in the 497 bp upstream from the TTG of *albI*. Transfer of pEco646 into the two *albI* mutants XaAM15 and XaAM45 also restored albicidin production, confirming that *albI* was involved in albicidin production, and suggested that *albI* and *albIV* are not in the same operon.

The two *albIV* mutants were complemented with cosmids pEco33lacZ and pEco33rev. pEco33lacZ contains *albIII* and *albIV* in the forward orientation of the *lacZ* promoter. pEco33rev contains the same DNA insert as pEco33lacZ but in the reverse orientation of the *lacZ* promoter. Transfer of pEco33lacZ and pEco33rev into the two *albIV* mutants XaAM7 and XaAM52 restored albicidin production. These results confirmed that *albI* and *albIV* are in two different operons and that *albIV* is under the control of a promoter located in the 706 bp preceding the GTG of *albIV*.

The two *albIX* mutants were complemented by cosmids pEco4 and pEco4SalI. pEco4 contains *albVII*, *albVIII*, and *albIX* in the reverse orientation of the *lacZ* promoter. pEco4 also contains DNA fragment D' formed by the last 1,593 bp of the 2,823 bp of *albIV* plus the last 632 bp of XALB1 (Fig. 1). pEco4SalI contains *albIX* and the 545 bp upstream from *albIX*. Transfer of pEco4 and pEco4SalI into the two *albIX* mutants (XaAM4 and XaAM29) restored albicidin production, indicating that *albIX* is not expressed as part of an operon and that *albIX* is under the control of a promoter located in the 545 bp upstream *albIX*.

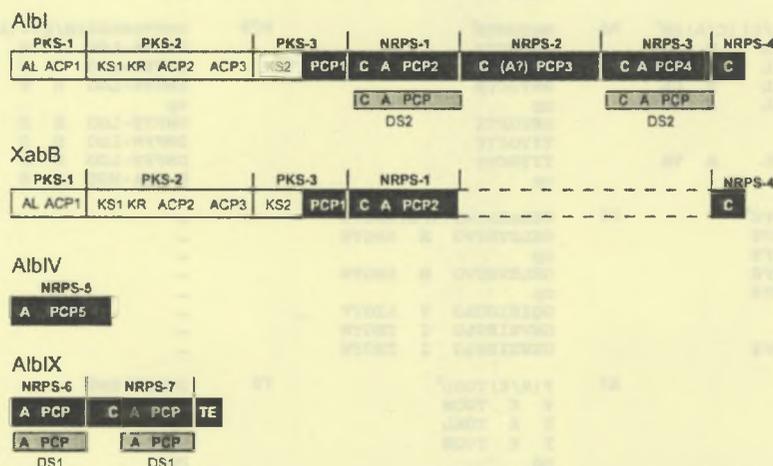


Fig. 2. Organization of the three polyketide synthase (PKS) modules and the seven nonribosomal peptide synthase (NRPS) modules identified in cluster XALB1, and comparison with the organization of XabB described in strain Xa13 from Australia (Huang et al. 2001). Dotted box corresponds to the deletion of NRPS-2 and NRPS-3 modules in XabB compared with AlbI. Shaded boxes correspond to duplicated sequences DS1 and DS2 located in AlbIX and AlbI, respectively. Abbreviations: A = adenylation, ACP = acyl carrier protein, AL = acyl-CoA ligase, C = condensation, KR = β -ketoacyl reductase, KS = β -ketoacyl synthase, NRPS = nonribosomal peptide synthase, PCP = peptidyl carrier protein, PKS = polyketide synthase, TE = thioesterase. Question mark in NRPS-2 domain indicates that this A domain is incomplete.

Sequence analysis of *ablI*, *albIV*, and *albIX* genes.

The proposed translational start site of *ablI* (GTG) is preceded by a consensus ribosomal binding site (GAGGG) and begins at nucleotide 30,166. The *ablI* gene is 20,640 bp in length, ending at nucleotide 50,805. The proposed translational start site of *albIV* (GTG) is preceded by a consensus ribosomal binding site (GAGG) and begins at nucleotide 52,382. The *albIV* gene is 2,826 bp in length, ending at nucleotide 55,207. The proposed translational start site of *albIX*

(ATG) is preceded by the less conserved ribosomal binding site (GTGG) and begins at nucleotide 24,882. The *albIX* gene is 5,880 bp in length, ending at nucleotide 19,003. Using the terminator program (Brendel and Trifonov 1984), a putative rho-independent terminator was identified downstream from *albIV* (data not shown). No putative rho-independent terminators were found downstream from *ablI* and *albIX*. The 236 bp upstream from *ablI* are 100% identical to the sequence upstream from *xabB* of *X. albilineans* strain Xa13 that was de-

Table 3. Comparison of conserved sequences in adenylation (A) condensation (C) peptidyl carrier protein (PCP), and thioesterase (TE) domains of peptide synthases and in putative A, C, PCP and TE domains of the Alb modules^a

Core	Sequence	Core	Sequence	Core	Sequence	Alb module
C1	SxAQxR (L/M) (W/Y) xL ^b	A1	L (T/S) YxEL ^b	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE ^b	---
	TYAQER L W LV		W S YAQL		GRQDFEVKVRGHRVDTRQVE	NRPS-1
	STAQER M W FL		L S YAQL		GSLDVQSRIDDPRI DL CVVE	NRPS-2
	SYAQER L W LV		W S YAQL		GRQDFEVKVRGHRVDTRQVE	NRPS-3
	SLFQER L W FV		np		np	NRPS-4
	np		M S YGQL		GRKDSQIKLRGYRIELGEIE	NRPS-5
	np		L S YAQL		GRRDYEVKVRGYRVDVRQVE	NRPS-6
SYQQR L W FV	L S YAQL	GRRDYEVKVRGYRVDVRQVE	NRPS-7			
C2	RHExLRTxP ^b	A2	LKAGxAYL (V/L) P (L/I) D ^b	A9	LPxYM (I/V) P ^b	---
	RHEVLRTRF		FKAGACY- V P I D		LPTYM L P	NRPS-1
	RHA VLRTHF		SLCGAAS- V L I D		LPDYL L P	NRPS-2
	RHEVLRTRF		FKAGACY- V P I D		LPTYM L P	NRPS-3
	RHEILRTRF		np		np	NRPS-4
	np		MKAGAAY- V P I D		LPEYM L P	NRPS-5
	np		LKAGGCY- V P L D		LPTYM L P	NRPS-6
RHETLRTRI	LKAGGCY- V P L D	LPTYM L P	NRPS-7			
C3	MHHxISDG (W/V) S ^b	A3	LAYxxyTSG (S/T) TGxPKG ^b	A10	NGK (V/L) DR ^b	---
	IHHIISDG W S		LACVMVTSG S TGRPKG		NGK L DR	NRPS-1
	IHHIVFDG W S		TRTIMVESG S LSSRL		HGR V DL	NRPS-2
	IHHIISDG W S		LACVMVTSG S TGRPKG		NGK L DR	NRPS-3
	MHHLIYDA W S		np		np	NRPS-4
	np		PVYCIYTS S TGSPKG		NGK V NR	NRPS-5
	np		LAYVMYTS S TGRPKG		NGK L DT	NRPS-6
MHHIICDG W S	LAYVMYTS S TGRPKG	NGK L DT	NRPS-7			
C4	YxD (F/Y) AVW ^b	A4	FDxS ^b	---	---	
	YAD Y ALW		FAVS	---	NRPS-1	
	YAD Y ARW		FDAA	---	NRPS-2	
	YAD Y ALW		FAVS	---	NRPS-3	
	YAD Y AIW		np	---	NRPS-4	
	np		FDLT	---	NRPS-5	
	np		FAIS	---	NRPS-6	
YAD Y ATW	FAIS	---	NRPS-7			
C5	(I/V) Gx ^b FVNT (Q/L) (C/A) xR ^b	A5	NxYGTE ^b	PCP	Dx ^b FFx ^b LGG (H/D) S (L/I) ^b	---
	I GFFINI L P LR		NNGYCTE		DNFFA-LGG H S L	NRPS-1
	I GLFVNT L A VR		AAYGNAE		DNFFE-LGG H S V	NRPS-2
	I GFFINI L P LR		NNGYCTE		DNFFA-LGG H S L	NRPS-3
	I GFFINI L P LR		np		np	NRPS-4
	np		NEYGTE		DNFFE-LGG H S L	NRPS-5
	np		YIYGCTE		DNFFN-LGG H S L	NRPS-6
I GFFVNI L A VR	YIYGCTE	DNFFN-LGG H S L	NRPS-7			
np	np	D-FFA-VGG H S V	PKS-3			
C6	(H/N) QD (Y/V) PFE ^b	A6	GELxIxGxG (V/L) ARGYL ^b	---	---	
	H QS V PFE		GELHVESVG M ARGYW	---	NRPS-1	
	H QD V PFE		np	---	NRPS-2	
	H QS V PFE		GELHVESVG M ARGYW	---	NRPS-3	
	N QA L PFE		np	---	NRPS-4	
	np		GQIHIGGAG V AICYV	---	NRPS-5	
	np		GEVHIESLG I THGYW	---	NRPS-6	
H RA L PFE	GEVHIESLG I THGYW	---	NRPS-7			
C7	RDxSRNPL ^b	A7	Y (R/K) TGD ^b	TE	G (H/Y) SxG ^b	---
	RDSSQIPL		Y K TGD		np	NRPS-1
	RDTARNPL		Y K TDAL		np	NRPS-2
	RDSSQIPL		Y K TGD		np	NRPS-3
	RDTSRIPL		np		np	NRPS-4
	np		Y A SGDL		np	NRPS-5
	np		Y R TGD		np	NRPS-6
RDSSQIPL	Y R TGD	G W SSG	NRPS-7			

^a As determined by Marahiel and associates (1997); np = not present.

^b Conserved sequences in A, C, PCP and TE domains in peptide synthases as determined by Marahiel and associates (1997); nonconserved amino acids are indicated in bold.

scribed as containing a functional promoter during the phase of albicidin accumulation in *X. albilineans* (Huang et al. 2001). There are no close matches to the *E. coli* σ 70 promoter consensus sequence in the 706 bp preceding the GTG start codon of *albIV* and in the 545 bp preceding the ATG start codon of *albIX*.

Analysis of the albicidin synthases AlbI, AlbIV, and AlbIX.

Gene *albI* potentially encodes a protein of 6,879 amino acids (aa), designated AlbI, that is very similar to the potential product of the *xabB* gene from *X. albilineans* strain Xa13 from Queensland (Huang et al. 2001). Comparison of AlbI with XabB revealed that i) XabB is smaller (4,801 aa), ii) the N-terminal regions from Met-1 to Ile-4325 of both proteins are identical except for five amino acids, and iii) the AlbI C-terminal region from Arg-6404 to the stop codon is 100% identical to the XabB C-terminal region from Arg-4326 to the stop codon.

The N-terminal region (from Met-1 to Asp-3,235) of AlbI is 100% identical to the corresponding region in XabB, which previously was described as similar to many microbial modular PKS (Huang et al. 2001). This PKS region may be divided into three modules (Fig. 2). The module designated PKS-1 contains acyl-CoA ligase (AL) and acyl carrier protein (ACP1) domains. The module designated PKS-2 contains β -ketoacyl synthase (KS1) and β -ketoacyl reductase (KR) domains followed by two consecutive ACP domains (ACP2 and ACP3). The module designated PKS-3 contains a KS domain (KS2) followed by a PCP domain (PCP1). The motifs characteristic of these domains are 100% identical to those of XabB, which previously were aligned with those from other organisms (Huang et al. 2001).

The PKS part of AlbI is linked by the PCP1 domain to four nonribosomal peptide synthase modules designated NRPS-1, NRPS-2, NRPS-3, and NRPS-4 (Fig. 2). NRPS-1, NRPS-2, and NRPS-3 modules display the ordered C, A, and PCP domains typical of such enzymes (Marahiel et al. 1997), and NRPS-4 consists of a single C domain which may correspond to an incomplete NRPS module. Sequences characteristic of C, A, and PCP domains are conserved in these four NRPS, except in the A domain of the NRPS-2 module, suggesting that this latter A domain may be nonfunctional (Table 3). Comparison with XabB revealed that the NRPS-2 and NRPS-3 modules were not present in XabB, which contains only NRPS-1 and NRPS-4 modules (Fig. 2).

The potential product of *albIV*, designated AlbIV, is similar to the BA3 peptide synthase involved in bacitracin biosynthesis in *Bacillus licheniformis* (Table 2). AlbIV forms one NRPS module, designated NRPS-5, that contains only an A domain and a PCP domain (Fig. 2). Sequences characteristic of A and PCP domains are conserved in AlbIV (Table 3). The A domain present in AlbIV differs, however, from A domains commonly found in peptide synthases: conserved sequences corresponding to cores A8 and A9 in AlbIV are separated by a very long peptide sequence of 390 aa. This additional peptide sequence exhibits a significant similarity to the predicted *N,O*-acyltransferase FeeH (397 aa) involved in the substitution of an oxygen for an amide NH, leading to the conversion of a peptide bond (R-CO-NH-R') to an ester bond (R-CO-O-R') during the biosynthesis of a long-chain *N*-acetyltyrosine from an environmental DNA gene cluster (Brady et al. 2002) (Table 2).

The potential product of *albIX*, designated AlbIX, is composed of two NRPS modules, designated NRPS-6 and NRPS-

Table 4. Comparison of signature sequences of Alb nonribosomal peptide synthase (NRPS) modules

Signature or code	GsrA (Phe) numbering									
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
Alb NRPS-5^a	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K
BacC-M5 (Asn)	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K
TyrC-M1 (Asn)	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K
Asn code	D	L	T	K	L	G	E	V	G	K
Alb NRPS-1^b	A	V	K	Y	V	A	N	D	A	K
Alb NRPS-3	A	V	K	Y	V	A	N	D	A	K
Alb NRPS-6	A	I	K	Y	F	S	I	D	M	K
Alb NRPS-7	A	I	K	Y	F	S	I	D	M	K
TyrB-M1 (Pro)	D	V	Q	S	I	A	N	V	V	K
VirS (Pro)	D	V	Q	Y	A	A	H	V	M	K
EntF-M1 (Ser)	D	V	W	H	F	S	L	V	D	K
β -Ala code	V	D	W	V	I	S	L	A	D	K
Alb NRPS-1^c	A	F	V	Y	V	A	N	D	A	K
Alb NRPS-3	A	F	V	Y	V	A	N	D	A	K
Alb NRPS-6	A	F	V	Y	F	S	I	D	M	K
Alb NRPS-7	A	F	V	Y	F	S	I	D	M	K
DhbE (DHB)	N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	K
EntE (DHB)	N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	K
YbtE (Salicylate)	N	F	C	A	Q	G	V	L	C	K
PchD (Salicylate)	N	F	C	A	Q	G	V	L	C	K
RifA (AHB) ^d	L	F	S	A	L	G	A	G	A	K

^a Alb NRPS-5 signature sequence determined according to the model proposed by Stachelhaus and associates (1999) compared with those of BacC-M5 (Asn) (Bacitracin synthetase 3, accession no. AAC06348) and TyrC-M1 (Asn) (Tyrocidine synthetase 3, accession no. AAC45930) and with the Asn code (Asn selectivity-conferring code defined by Stachelhaus and associates [1999]). Alb NRPS signature sequences are indicated in bold.

^b Alb NRPS-1, -3, -6 and -7 signature sequences determined according to the model proposed by Stachelhaus and associates (1999) compared with those of Tyr-M1 (Pro) (Tyrocidine synthetase 2 module 1, accession no. AAC45929), VirS (Pro) (Virginiamycin S synthetase, accession no. CAA72310) and EntF-M1 (Ser) (Enterobactin synthetase, accession no. AAA92015), and with the β -Ala code (β -Ala selectivity-conferring code defined by Du and associates [2000]).

^c Alb NRPS-1, -3, -6 and -7 signature sequences determined according to the model proposed by May and associates (2002) compared with those of DhbE (DHB) (Bacillibactin synthetase 1, accession no. AAN15214), EntE (DHB) (Enterobactin synthetase, accession no. CAB15188), YbtE (Salicylate) (Yersiniabactin synthetase, accession no. NP-669710), PchD (Salicylate) (Pyochelin synthetase, accession no. AAD55799) and RifA NRPS (AHB) (Rifamycin synthase RifA, accession no. AAC01710).

^d AHB = 3-amino-5-hydroxybenzoate and DHB = 2,3-dihydroxybenzoate.

7. Sequences characteristic of domains A, C, and PCP are conserved in AlbIX (Table 3). NRPS-6 contains only one A and one PCP domain. NRPS-7 contains the three domains characteristic of NRPS modules (A-C-PCP) followed by a TE domain (Fig. 2; Table 3). This TE domain contains the "nucleophile elbow" GWSSG which is very similar to the consensus sequence described by Guenzi and associates (1998) for syringomycin synthetase (GGWSAGG).

Analysis of the substrate specificity regions of AlbI, AlbIV, and AlbIX.

Preliminary specificity assignments of albidin synthases AlbI, AlbIV, and AlbIX NRPS modules were made by comparison of complete sequences between conserved motifs A4 and A5 with sequences in the GenBank database. The corresponding sequence of the AlbIV NRPS-5 module is most related to domain 5 of bacitracin synthase 3 (BA3) from *B. licheniformis* that was suggested to activate Asn (Konz et al. 1997). Corresponding sequences of AlbI and AlbIX NRPS-1, NRPS-3, NRPS-6, and NRPS-7 modules, apart from their very high similarity with XabB, exhibited the highest degree of overall identity (39%) with the Blm NRPS-2 module of the biosynthetic gene cluster for bleomycin from *Streptomyces verticillus* that specifies for β -Ala (Du et al. 2000). The sequence between motifs A4 and A5 of the AlbI NRPS-2 could not be aligned significantly with any sequence present in the GenBank database. Comparison of this sequence with the corresponding sequence of GrsA (Phe) revealed that parts of the putative core and structural "anchor" sequences of AlbI NRPS-2 are deleted, suggesting that the AlbI NRPS-2 substrate binding pocket is not functional.

Using predictive models for NRPS substrate specificity, the AlbIV NRPS-5 signature is 100% identical to the BacC-M5 (Asn) and the TyrC-M1 (Asn) signatures (Table 4). The AlbIV NRPS-5 signature also is identical to the Asn code, except that L is replaced by I at position 299 (Table 4). On the other hand, the AlbI and AlbIX NRPS-1, -3, -6, and -7 signatures did not match any of the defined codes, indicating that the substrates bound by these pockets are not yet known. The AlbI and AlbIX NRPS-1, -3, -6, and -7 signatures diverged from all NRPS signatures previously described, except from the XabB signature that is identical to the AlbI NRPS-1 and -3 signatures. The signature most closely related to AlbI NRPS-1 and -3 specify Pro and the signature most closely related to AlbIX NRPS-6 and -7 specify Ser, but the degree of similarity in both cases is very weak (Table 4).

Comparison of XALB1 with the *xabB* *EcoRI* fragment.

The 16,511-bp DNA sequence of the *EcoRI* fragment described by Huang and associates (2001) as including full-length *xabB* from Queensland strain Xa13 is identical to the 22,745-bp DNA sequence of the *EcoRI* fragment including *albi* from Florida strain Xa23R1 (Fig. 1), except that i) 5 nucleotides (nt) are different at positions 42,963, 42,972, 42,980, 43,014, and 43,071 of the XALB1 sequence, and ii) 6,234 nt, from positions 43,137 to 49,370, are missing from the *xabB* gene sequence. The missing DNA sequence corresponds to one copy of the 2,727-bp DS2 duplicated sequence plus the region between the two copies of the DS2 duplicated sequence (Figs. 1 and 2).

In order to compare the activity of *xabB* and *albi*, pALB571, pALB646, and pEco646 were transferred by conjugation into *xabB* mutant LS157R1 (LS155-*xabB*::Tn5). Transfer into this mutant of the 16.5-kb *EcoRI* fragment cloned from *X. albilineans* strain Xa13 and containing *xabB* previously was shown to restore albidin production (Huang et al. 2001). In the present study, we demonstrated that the transfer of pALB571,

pALB646, and pEco646 into *xabB* mutant LS157R1 (LS155-*xabB*::Tn5) also restored albidin production.

Confirmation of the XALB1 DNA sequence by Southern blot analyses.

Southern blot hybridizations were performed to compare the actual restriction patterns of XALB1 with the theoretical restriction profiles determined from the 55,839-bp XALB1 DNA sequence (GenBank accession number AJ586576). Total genomic DNA from Xa23R1 and plasmid DNA of the pALB571 cosmid were digested by *EcoRI*, *NcoI*, *PstI*, *SacI*, and *KpnI* and hybridized with three different probes: i) a small probe of 403 bp which corresponds to the part of the large 2,737-bp DS2 internal duplication that does not encode conserved sequences from the C, A, or PCP domains; ii) the pBC/C plasmid; and iii) pALB571. The 403-bp probe corresponded to a polymerase chain reaction (PCR) fragment amplified from cosmid pALB571 using primers AlbrepeatF (5'cgacaccagaactcccg3') and AlbrepeatR (5'actgcccatcgtcctcage3'). The DNA sequence of this small probe did not match any other sequence of the databases except *xabB*. The 403-bp probe revealed the presence of the same DNA fragments in Xa23R1 and pALB571 corresponding in size to the theoretical restriction profiles: i) a unique DNA fragment containing the two copies of the large internal duplication DS2 for *EcoRI* and *SacI*; and ii) two separate DNA fragments, each containing one of the two copies of the large internal duplication DS2 for *NcoI*, *PstI*, and *KpnI*. The pALB571 and pBC/C probes revealed in Xa23R1 and pALB571 the presence of DNA fragments corresponding in size to the theoretical profiles determined from the 55,839-bp XALB1 DNA sequence and from the pUFR043 map (De Feyter and Gabriel 1991).

Southern blot hybridization also was performed to look for the presence of the large internal duplication DS2 in seven strains (not including Xa13 but including the *X. albilineans* mutant LS156R1, LS155-*xabA*::Tn5) (Huang et al. 2000b) iso-

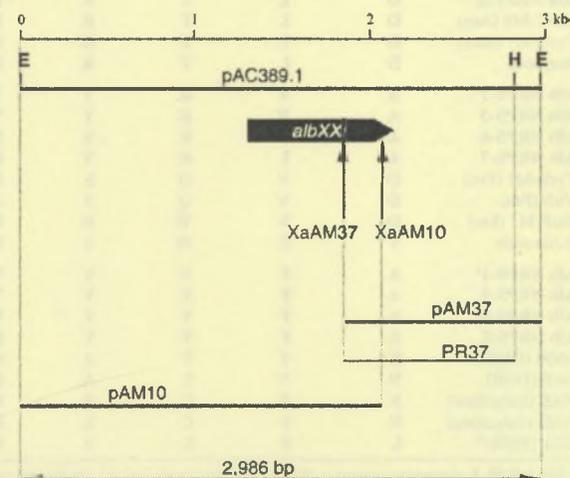


Fig. 3. Physical map and genetic organization of the DNA region containing gene cluster XALB2 involved in albidin production. Restriction maps: E and H are restriction sites for *EcoRI* and *HindIII*, respectively. The DNA insert carried by plasmid pAC389.1 is represented by the bar at the top of the figure. Position of Tn5 insertional sites of mutants XaAM37 and XaAM10 determined by sequencing are indicated by vertical arrows. DNA region corresponding to Tn5 flanking sequence in pAM37 and pAM10 plasmids and in PR37 DNA fragment are represented by bars at the bottom of the figure. Genetic organization: The location and direction of *albXXI* is indicated by a black and thick arrow.

lated from five different countries (Australia, Reunion Island, Kenya, Zimbabwe, and the United States). Total genomic DNA of these seven strains was digested by *KpnI* and *EcoRI*, and hybridized with the 403-bp probe and with the pBC/C plasmid. Both probes revealed the presence of the two *KpnI* DNA fragments corresponding in size to XALB1 fragments B and C and one unique *EcoRI* fragment corresponding in size to the XALB1 23-kb fragment (data not shown). These results indicated that all strains in the present study contain *ablI* and not *xabB* because, in *ablI*, both the 403-bp and the pBC/C plasmid probes hybridized with the large internal duplication DS2 present in both DNA fragments B and C (Fig. 1).

Cloning and sequencing of the XALB2 gene cluster.

The flanking sequence of the Tn5 insertional site from mutant XaAM37, which was not complemented by either pALB540 or pALB571 (Rott et al. 1996), was used to identify cosmid pALB389. A fragment of the insert of pALB389 was subcloned into plasmid pAC389.1 (Table 1) and both plasmids complemented mutant XaAM37, confirming that the second region involved in albicidin production, XALB2, was present in the insert of pAC389.1. Another albicidin-defective mutant, XaAM10, also was complemented by pALB389 and pAC389.1. The complete double-strand nucleotide sequence of the 2,986-bp *EcoRI*-*EcoRI* insert of pAC389.1 was determined by sequencing plasmids pAC389.1, pAM10, and pAM37 (Fig. 3). The Tn5 insertional sites of XaAM10 and XaAM37 were located at position 2,107 and 1,882, respectively.

Homology analysis and genetic organization of XALB2.

The sequence of 2,986 bp containing XALB2 is 99.4% identical to the sequence of 2,989 bp containing *xabA* described in *X. albilineans* strain LS155 from Queensland (Huang et al. 2000b). The Tn5 insertional site of mutant LS156 described in *xabA* (Huang et al. 2000b) is 15 bp upstream from the insertional site of XaAM37. The ORF disrupted in XaAM37 and XaAM10, designated *albXXI*, is identical to *xabA* (837 bp), except that a C replaces a T at position 1,642 of XALB2. The potential product of *albXXI* is 100% identical to the potential product of *xabA*, described as a phosphopantetheinyl transferase (Huang et al. 2000b). There are no

close matches to the *E. coli* σ 70 promoter consensus sequence, and no putative RBS site upstream from the putative start codon ATG of *albXXI*. The putative factor-independent transcription site described at 42 bp downstream from the TGA stop codon of *xabA* (Huang et al. 2000b) also is present at the same position downstream from *albXXI*.

DISCUSSION

Several NRPS gene clusters have been described for toxin production by phytopathogenic pseudomonads (Guenzi et al. 1998; Scholz-Schroeder et al. 2001, 2003), but this study describes for the first time a complete mixed PKS-NRPS biosynthetic gene cluster for toxin production in the genus *Xanthomonas*. Comparison of *ablI* and *xabB* suggests that the XALB1 gene cluster from *X. albilineans* strain Xa23R1 from Florida differs significantly from the albicidin gene cluster from *X. albilineans* strain Xa13 from Queensland. The difference between the two clusters may be important because the deletion of 6,234 bp in *xabB* could mean that the two clusters do not encode the same toxin. Our results indicated that all strains in the present study contain *ablI* and not *xabB*, and that *xabB* and *ablI* complemented the same albicidin-defective mutant LS157. Alternatively, it is possible that the reported DNA sequence of *xabB* is simply incomplete and missing 6,234 bp of DNA sequence encoding 2,078 aa.

Our mutagenesis and complementation results demonstrated that three PKS and NRPS genes (*ablI*, *albIV*, and *albIX*) are involved in albicidin biosynthesis. XALB1 potentially also may encode i) one hydroxybenzoate-CoA ligase, AlbVII; ii) two methyltransferases, AlbII and AlbVI; iii) one esterase, AlbXI; iv) one para-amino benzoate synthase, AlbXVII; v) one hydroxybenzoate synthase, AlbXX; vi) one carbamoyl transferase, AlbXV; vii) one amino-deoxychorismate lyase, AlbXVIII; viii) two regulatory proteins, AlbIII and AlbVIII; ix) two resistance proteins, AlbXIV and AlbXIX; and x) three additional proteins, AlbX, AlbXII, and AlbXIII, similar to proteins with unknown functions. One resistance gene, *albF* (100% identical to *albXIV*), and one modifying gene, *xabC* (100% identical to *ablI*), previously were described as respectively involved in albicidin resistance (accession number

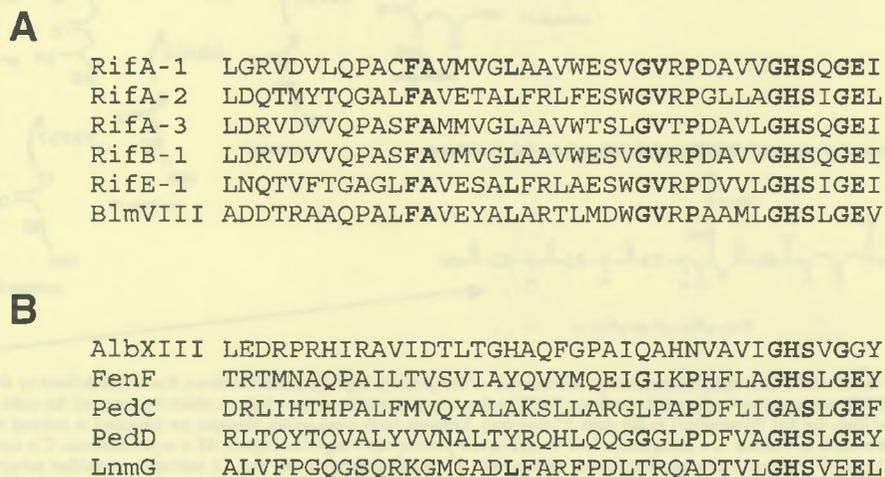


Fig. 4. **A**, Alignment of the conserved motifs in acyltransferase (AT) domains from several polyketide synthase modules, RifA-1, -2, and -3, RifB-1, Rife-1 (Rifamycin synthase) (August et al. 1998), and BlmVIII (Bleomycin synthase) (Du et al. 2000). Identical amino acids are shown in bold. **B**, Alignment of several trans-acting AT domains from AlbXIII (this study), FenF (mycosubtilin synthase) (Duitman et al. 1999), PedC and PedA (pederin synthase) (Piel 2002), and LnmG (leinamycin synthase) (Cheng et al. 2003). Amino acids identical to conserved AT domains motifs are shown in bold.

AA101877) and in albicidin biosynthesis (Huang et al. 2000a). Additionally, *albV* is 100% identical to the *thp* gene described by Huang and associates (2000a). Insertional mutagenesis of the *thp* gene blocked albicidin production but *trans*-complementation of the *thp* mutant with the *thp* gene failed (Huang et al. 2000a), indicating the involvement in albicidin production of a downstream gene in a putative *thp* operon. This operon may contain *albVI*, *albVII*, or *albVIII* but not *albIX* because *albIX* mutants were complemented by pEco4. Further mutagenesis studies will be necessary to confirm the involvement of the other XALB1 ORFs in albicidin biosynthesis.

Most of the bacterial NRPS gene clusters described up to now are organized along the chromosome in a linear order that parallels the order of amino acids in the resultant peptide, following the "colinearity rule" for the NRPS-template assembly of peptides from amino acids (Cane 1997; Cane and Walsh

1999; Cane et al. 1998; von Döhren et al. 1999). The three PKS and seven NRPS modules encoded by XALB1 apparently are not organized according to this "colinearity rule" because of the following features: i) NRPS and PKS genes are expressed in two divergent orientations; ii) no AT domain was identified in PKS-2 and PKS-3 domains, suggesting involvement of a separate enzyme; and iii) the A domain of NRPS-2 is not functional, suggesting the involvement of a *trans*-acting A domain. An exception to the colinearity rule already has been reported for the syringomycin synthetase of *P. syringae* (Guenzi et al. 1998), for the exochelin synthetase of *Mycobacterium smegmatis* (Yu et al. 1998), and for the bleomycin synthetases of *S. verticillus* (Du et al. 2000).

The PKS-1 module that contains an AL domain and an ACP domain (ACP1) may be responsible for the initiation of the albicidin backbone assembly by loading a starter unit. The PKS-1 module is followed by the PKS-2 module, which con-

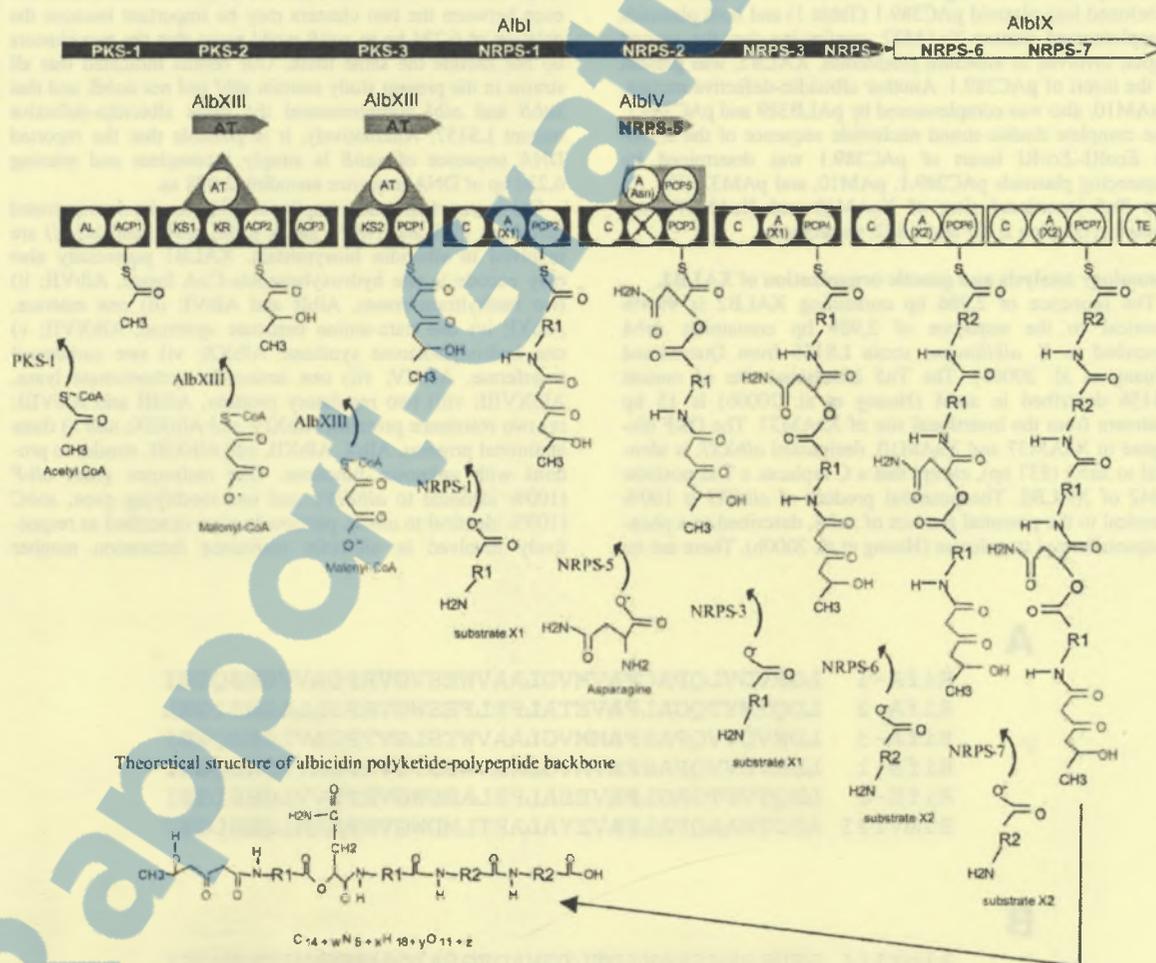


Fig. 5. Linear model for the albicidin megasynthetase-template assembly of the polyketide-polypeptide backbone. Genes are defined by thick arrows. Each polyketide synthase (PKS) and nonribosomal peptide synthase (NRPS) subunit is depicted by an open box, in which the type and the order of the individual domains are indicated from the left (N-terminal) to the right (C-terminal). Subunits from *trans*-acting domains are indicated in colored boxes. NRPS and PKS domains are abbreviated as follows: A = adenylation, ACP = acyl carrier protein, AL = acyl-CoA ligase, AT = acyltransferase, C = condensation, KR = ketoreductase, KS = ketoacyl synthase, PCP = peptidyl carrier protein. Asn designates asparagine. X1 and X2 indicate unidentified substrates incorporated by NRPS-1 and -3 and NRPS-6 and -7, respectively. The crossed A domain in NRPS-2 indicates that this deleted domain may be not functional. The intermediates of polyketide-polypeptide assembly are shown attached to the ACP or PCP domains at the point before intramolecular transfer to a succeeding KS or C domain. Green and blue colors show which portions of the albicidin backbone are provided by the two malonyl-CoA catalyzed by the *trans*-acting AT domain of AlbXIII. Pink color shows which portions of the albicidin backbone are provided by asparagine catalyzed by the *trans*-acting A domain of NRPS-5 (AlbIV). The O atom transferred by NRPS-5 at the level of the peptide bond between asparagine and substrate X1 is shown in bold.

tains a KS domain and a KR domain upstream from two ACP domains (ACP2 and ACP3), and it lacks any discernable AT domain. Tandem ACP domains are unusual within PKS modules but have been shown to occur in the biosynthesis of several fungal and bacterial polyketide synthases (Albertini et al. 1995; Mayorga and Timberlake 1992; Takano et al. 1995; Yu and Leonard 1995). However, the significance of the tandem ACP domains in these systems is unknown. The absence of an AT domain in the PKS-2 module suggests that a separate AT domain is indispensable for the elongation of the acyl-chain initiated by this module. Separate AT enzymes encoded elsewhere in the genome were described for PKS modules lacking AT domains in other systems (Albertini et al. 1995; Cheng et al. 2003; Duitman et al. 1999; Paitan et al. 1999; Zhu et al. 2002). The conserved motif GHSxG described in the discrete acyltransferases involved in these systems is present in AlbXIII, suggesting that this protein could complement the missing AT domain in PKS-2 (Fig. 4). The PKS-3 module is located upstream from the NRPS modules and, therefore, should be involved in the linkage of polyketide and polypeptide moieties. The presence of a KS domain in the PKS-3 module suggests the involvement of a *trans*-acting AT domain rather than an A domain. By analogy with the BlmVIII PKS module, which is involved in the linkage of polypeptide and polyketide moieties of bleomycin and which contains an AT domain followed by a PCP domain (Du et al. 2000), the presence of a PCP is not incompatible with the interaction of AlbI PKS-3 module with the putative *trans*-acting acyltransferase AlbXIII.

The NRPS-1, -2, and -3 modules display the ordered C, A, and PCP domains, suggesting that they are involved in the incorporation of three amino acid residues. The A domain of the NRPS-2 module exhibits poor consensus at A2, A3, A5, A7, A8, A9, and A10 motifs and lacks completely the A6 motif (Table 3). In addition, the NRPS-2 substrate binding pocket is partially deleted. These features strongly suggest that the NRPS-2 A domain is inactive and that the loading of an amino acid on the NRPS-2 PCP domain (PCP3) possibly is catalyzed by a *trans*-acting A domain. Similar *trans*-complementation of an incomplete and deleted A domain was described for bleomycin biosynthesis (Du et al. 2000). A putative candidate for this *trans*-acting A domain is the NRPS-5 A domain present in AlbIV because of the lack of a C domain in NRPS-5 (Fig. 2). As a consequence of the interaction between NRPS-2 and NRPS-5, two PCP domains (PCP-3 and PCP-5) must be involved in the binding of the amino acid activated by the NRPS-5 A domain. The presence of two PCP domains also was described for syringomycin biosynthesis during the interaction between SyrB, which contains A and PCP domains, and the last module of SyrE, which contains C and PCP domains (Guenzi et al. 1998). The existence of two PCP domains does not necessarily indicate a competition between them, because they could have different functions in the transfer of intermediates. The NRPS-4 module contains only a C domain, which may transfer the intermediate product synthesized by AlbI and AlbIV to the PCP-6 domain present in the AlbIX NRPS-6 module. The N-terminal A domain of the NRPS-6 module then may be involved in the incorporation of one amino acid residue. Similar transfers were described for mycosubtilin biosynthesis, in which the MycA and MycB C-terminal C domains interact with the MycB and MycC N-terminal A domains, respectively (Duitman et al. 1999). The NRPS-7 module which displays the ordered C, A, and PCP domains should be involved in the incorporation of the last amino acid residue. Indeed, this module also contains the single chain-terminating TE domain known to be responsible for detachment of the mature polyketide-polypeptide backbone from the complex of enzymes.

On the basis of the deduced functions of individual NRPS and PKS domains, we have aligned the three PKS and the seven NRPS modules and propose a model for the albicidin backbone biosynthesis (Fig. 5). In this model, PKS-1 is responsible for initiation of albicidin assembly by loading acetyl-CoA onto ACP1. PKS-2 and the *trans*-acting AlbXIII are responsible for loading malonyl CoA on ACP2 or ACP3. The KR domain present in PKS-2 is responsible for reduction of the CO function at position ²C of the albicidin backbone. PKS-3 and the *trans*-acting AlbXIII are responsible for loading malonyl CoA on PCP1. NRPS-1 and NRPS-3 are responsible for loading the same unknown substrate X1 on PCP2 and PCP4, respectively. NRPS-2 and the *trans*-acting NRPS-5 are responsible for loading asparagine on PCP3 or PCP5. The additional peptide, similar to the predicted *N,O*-acyltransferase FeeH present in the NRPS-5 A domain, could be responsible for conversion of the peptide bond between substrate X1 and asparagine to an ester bond as proposed for the FeeH protein (Brady et al. 2002). NRPS-6 and NRPS-7 are responsible for loading the same unknown substrate X2 on PCP6 and PCP7, respectively. The domain NRPS-7 TE is responsible for the detachment of the albicidin backbone.

The substrates of PKS-1, PKS-2, and PKS-3 proposed in our model correspond to the most common substrates of PKS enzymes (Du and Shen 2001). The substrates of NRPS-1 and -3 and NRPS-6 and -7, designated X1 and X2, respectively, in our model, remain unknown. Binding-pocket residues forming the NRPS codes have been classified according to their variability (Table 4) (Stachelhaus et al. 1999). According to this classification, residues Asp235 and Lys517, which mediate key interactions with the α -amino and α -carboxylate groups, respectively, of the substrate, are invariant. The AlbI and AlbIX NRPS-1, -3, -6, and -7 signatures are not totally in accord with this classification. Invariant residue Lys517 is conserved in the four NRPS signatures, indicating the presence of a carboxylate group in the corresponding substrates, but the Asp235Ala alteration is not consistent with an α -amino acid substrate. The Asp235Val alteration observed in the β -Ala specificity-conferring code (Table 4) suggests that substrates X1 and X2 are not α -amino acids but do contain an amino group and a carboxylate group. Identification of several aromatic rings in albicidin (Birch and Patil 1985a,b) suggests that X1 and X2 are aromatic substrates. A similar aromatic amino carboxy acid substrate, the 3-amino-5-hydroxybenzoate (AHB), is recognized specifically and activated by the RifA NRPS during rifamycin synthesis (Admiraal et al. 2001). The RifA NRPS is similar to other aryl acid-activating domains like DhbE, which specifies the 2,3-dihydroxybenzoate (DHB), and YbtE and PchD, which specify salicylate and for which aryl acid specificity codes were defined (May et al. 2002). These aryl acid-activating domains always are involved in the loading of a starter unit in which only the carboxylate group is involved in bond formation. The corresponding codes of AlbI NRPS-1 and 3 exhibit some similarity with the RifA (AHB) code (Table 4), supporting the idea that these two Alb NRPS modules specify an aromatic amino carboxy acid substrate. Nevertheless, AlbI and AlbIX NRPS-1, -3, -6, and -7 primary sequences between motifs A4 and A5 are more closely related to GsrA (Phe) and Blm NRPS-2 (β -Ala) than to RifA (AHB) and DhbE (DHB), supporting the idea that Alb NRPS modules, unlike aryl acid-activating domains, are involved in the loading of an extender unit in which both carboxylate and amino groups participate in the formation of peptide bonds.

The theoretical structure of the albicidin backbone synthesized according to our model (Fig. 5) is compatible with the chemical characteristics of albicidin from Hawaii strain LS2 described by Birch and Patil (1985a,b). The incorporation of

aromatic substrates by NRPS-1, -3, -6, and -7 means that the R1 and R2 groups from substrates X1 and X2, respectively, contain at least six carbon atoms, corresponding to one aromatic ring. The total number of carbon atoms in the theoretical structure of albicidin backbone then would be 38, which corresponds to the 14 carbon atoms indicated in Figure 5 plus the 24 carbon atoms (4×6) of R1 and R2. An additional carbon atom putatively would be added by the *O*-methyltransferases AlbII and AlbVI, leading to a total number of 40 carbon atoms in the final theoretical albicidin structure. This number is in accordance with the number of carbon atoms determined from proton and ^{13}C NMR spectroscopy (approximately 38 carbon atoms) (Birch and Patil 1985a,b). In addition, because there are two R1 groups and two R2 groups in albicidin, two equivalent carbon atoms from, for example, the two R1 groups, may have been interpreted as one by Birch and Patil, and the same could be true for the two R2 groups. The presence of a COOH group in the theoretical structure of the albicidin backbone also is compatible with the previous analysis of albicidin. Incorporation of the nonproteogenic substrates X1 and X2 and conversion of the peptide bond between substrate X1 and asparagine to an ester bond would explain why albicidin is insensitive to pronase (Birch and Patil 1985a,b). The presence of one ester bond also is in accord with the fact that albicidin is detoxified by the AlbD esterase (Zhang and Birch 1997). In vitro characterization of the substrates specifically incorporated by the AT and A domains present in the albicidin biosynthetic enzymes may allow us to confirm our model and to propose theoretical chemical structures. Comparison of these theoretical structures with the proton and ^{13}C NMR spectroscopy analyses of albicidin and preparation of synthetic samples corresponding to the proposed structures may help to confirm the structure of albicidin.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.

The source of bacterial strains and their relevant characteristics are described in Table 1. *X. albilineans* strains were cultured routinely on modified Wilbrink's (MW) medium at 28°C without benomyl (Rott et al. 1994). For long-term storage, highly turbid distilled water suspensions of *X. albilineans* were frozen at -80°C. For *X. albilineans*, MW medium was supplemented with the following antibiotics as required at the concentrations indicated: kanamycin at 10 or 25 µg/ml and rifampicin at 50 µg/ml. *E. coli* strains were grown on Luria-Bertani (LB) agar or in LB broth at 37°C and were maintained and stored according to standard protocols (Sambrook et al. 1989). For *E. coli*, LB medium was supplemented with the following antibiotics as required at the concentrations indicated: kanamycin at 50 µg/ml and ampicillin at 50 µg/ml.

Bacterial conjugation.

DNA transfer between *E. coli* donor (DH5α/relevant plasmid) (Table 1) and rifampicin-resistant *X. albilineans* recipients (*X. albilineans* strains XaAM) (Table 1) was accomplished by triparental conjugation with plasmid pRK2073 as the helper as described previously (Rott et al. 1996).

Albicidin production assay.

Albicidin production was tested by a microbiological assay as described previously (Rott et al. 1996). Rifampicin- and kanamycin-resistant exconjugants were spotted with sterile toothpicks (2-mm-diameter spots) onto plates of SPA medium (2% sucrose, 0.5% peptone, and 1.5% agar) and incubated at 28°C for 2 to 5 days. The plates then were overlaid with a mixture of *E. coli* DH5α (10^7 cells in 2 ml of distilled water) plus 2 ml of molten 1.5% (wt/vol) Noble agar (Difco, Becton

Dickinson, Le Pont de Claix, France) at approximately 65°C and examined for growth inhibition zones after 24 h at 37°C.

Nucleic acid manipulations.

Standard molecular techniques were used to manipulate DNA (Sambrook et al. 1989) except for total genomic DNA preparation of *X. albilineans*. Total genomic DNA of *X. albilineans* for Southern blot hybridization was prepared as described by Gabriel and De Feyter (1992).

PCR conditions.

PCR amplifications were performed in an automated thermal cycler PTC-100 (MJ Research, Inc, Watertown, MA, U.S.A.). The 25-µl PCR reaction mix consisted of 100 ng of genomic DNA or 1 ng of plasmid DNA, 2.5 µl of 10× PCR buffer without MgCl_2 (Eurobio, Les Ulis, France), 80 µM dNTP mix, 2.5 units of EUROBIOTAQII (Eurobio), 25 pmoles of each primer, 2.0 mM MgCl_2 (Eurobio), and sterilized distilled water to final volume. The PCR program was 95°C for 2 min, 25 cycles at 94°C for 1 min, T_m (melting temperature) for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final 72°C extension for 5 min. T_m temperature was determined for each pair of primers and varied between 55 and 60°C. A 5-µl aliquot of each amplified product was analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel. For sequencing, PCR products were cloned with the pGEM-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.).

Oligonucleotide synthesis and DNA sequencing.

Oligonucleotides were purchased from Genome Express (Grenoble and Montreuil, France). Automated DNA sequencing was carried out on double-stranded DNA by the dideoxynucleotide chain termination (Sanger et al. 1977) using a Dye Terminator Cycle Sequencing kit and an ABI Perkin-Elmer sequencer according to the manufacturer's procedure. Both DNA strands were sequenced with universal primers or with internal primers (20 mers). This service was provided by Genome Express (Grenoble, France). Computer-aided sequence analyses were carried out using Sequence Navigator (Applied Biosystems, Inc., Norwalk, CT, U.S.A.) and SeqMan (DNASTAR Inc., Madison, WI, U.S.A.) programs.

Sequence analysis.

Nucleotide sequences were translated in all six reading frames using EditSeq (DNASTAR Inc.). Potential products of ORFs longer than 100 bases were compared with protein databases by the PSI-BLAST program (Swiss-Prot and GenBank) on the NCBI site using the Altschul program (Altschul et al. 1997).

Sequencing of the 55,839-bp region from *X. albilineans* containing XALB1.

DNA fragments F, E, B, C, I, and G, generated by the digestion of cosmid pALB571 (Rott et al. 1996) with *EcoRI*, *KpnI*, or both, were subcloned into pBCKS (+) and were sequenced from the resulting subclones, pBC/F, pBC/E, pBC/B, pBC/C, pBC/I, and pBC/G. DNA fragment D', which corresponds to the part of fragment D present in cosmid pALB571, was sequenced from plasmid pUFR043/D', obtained following self ligation of the complete *EcoRI*-digested cosmid pALB571. DNA fragment H was sequenced from pAM45.1 (Rott et al. 1996), obtained following cloning into vector pBR325 of the 12-kb *EcoRI* fragment carrying Tn5 and flanking sequences from mutant strain XaAM45. DNA fragment A' contains the part of fragment A present in cosmid pALB571 and was subcloned into vector pBCKS (+), and the resulting plasmid pBC/A' was used for sequencing. The presence of a large inter-

nal duplication made alignment of sequence data obtained from pBC/A' difficult. This difficulty was resolved using sequence data obtained from an additional plasmid, pAM4, obtained following cloning into vector pBluescript II KS (+) of the 12-kb *EcoRI* fragment carrying Tn5 and flanking sequences from mutant strain XaAM4, which contains only one copy of the large internal duplication. Sequence data from pBC/A' were used to determine the first 1,543 bp of fragment A' between nucleotides C-19,001 and G-20,543. Sequence data from pAM4 and pBC/A' were used to determine the last 4,825 bp of fragment A' between nucleotides G-21,653 and G-26,477. The overlapping region between nucleotides G-20,469 and C-22,159 was amplified by PCR from cosmid pALB571 using primers contig13-1160 (5'gctaccgtgtccagtagg3') and pAM4-14 (5'gctggaaaccgagaatctga3'), and was sequenced. Resulting sequence data were used to complete sequencing of DNA fragment A'. The junctions A/F, F/H, H/E, E/B, B/C, C/I, I/G, and G/D between corresponding DNA fragments were sequenced directly from cosmid pALB571. An *EcoRI* DNA fragment containing fragments A and F was subcloned from pALB540 into pBCKS (+), and the resulting plasmid pBC/AF was used to determine the part of DNA fragment A which was not present in cosmid pALB571 between nucleotides G-13,682 and G-19,001. *EcoRI* DNA fragments J, K, L, and N were subcloned from pALB540 into pBCKS (+) and were sequenced from resulting plasmids pBC/J, pBC/K, pBC/L, and pBC/N. The junctions L/K, K/J, and J/A between corresponding DNA fragments were sequenced directly from cosmid pALB540. The DNA region between nucleotides G-7,517 and T-8,721 was amplified by PCR from cosmid pALB540 using primers E114 (5'gacacgatcagccgctagga3') and E14-380 (5'accagcagttggccagcct3') and sequenced. The resulting sequence data were used to determine the sequence of fragment M and of junctions N/M and M/L. The double-strand nucleotide sequence of 55,839 bp containing the entire gene cluster XALB1 has been deposited with GenBank (accession number AJ586576).

Subcloning of *albiI*, *albIV*, and *albIX* genes.

pEco646 resulted from complete digestion of pALB646 by *EcoRI* and self ligation. pEco33lacZ and pEco4 resulted from a partial *EcoRI* digestion and self ligation of pALB571. The *EcoRI-XbaI* insert of pEco33lacZ containing DNA fragments G and D' was subcloned into pBKS between *EcoRI* and *XbaI* sites. The *KpnI-XbaI* insert from the resulting plasmid was cloned between *KpnI* and *SpeI* sites of a modified pUFR043 plasmid in which a *SpeI* site was added at the level of the *EcoRI* site using an *EcoRI/SpeI* adaptor (5'aattgactagtc3'), and the resulting plasmid was designated pEco33 rev. Plasmid pEco4SalI resulted from the complete *SalI* digestion and self ligation of pEco4.

Cloning and sequencing of the XALB2 gene cluster.

The 6-kb *EcoRI* fragment carrying Tn5 and flanking sequence from strain XaAM37 was cloned in pBR325 and the resulting plasmid was designated pAM37 (Table 1). A 1.1-kb *HindIII-HindIII* DNA fragment from pAM37, named PR37 (Table 1), was used to probe the 845 clones from the previously described genomic library of *X. albilineans* strain Xa23R1 (Rott et al. 1996). Eight new cosmids hybridized to this probe and restored albicidin production in mutant XaAM37. One of these cosmids, pALB389, carrying an insert of approximately 37 kb (Table 1), was used for complementation studies of the five mutants not complemented by pALB540 and pALB571. A 3-kb *EcoRI-EcoRI* DNA fragment from pALB389 that hybridized with probe PR37 was subcloned into pUFR043 (Table 1), and the resulting plasmid pAC389.1 was used for complementation studies. The 7-kb

EcoRI fragment carrying Tn5 and flanking sequence from strain XaAM10 was cloned in pBluescript II KS (+), and the resulting plasmid was designated pAM10 (Table 1). The sequence between the *EcoRI* site and the Tn5 insertional site of mutants XaAM10 and XaAM37 was sequenced from pAM10 and pAM37, respectively. The double-stranded nucleotide sequence of 2,986 bp containing XALB2 was deposited with GenBank (accession number AJ586577).

Sequencing of the Tn5 insertional site of each *Tox⁻* mutant.

The Tn5 insertional site of each *Tox⁻* mutant was sequenced from plasmids obtained following cloning in pBR325 or pBluescript II KS (+) of the *EcoRI* fragments carrying Tn5 and flanking sequence using the sequencing primer GUSN (5'tgccacagccgctcgagt3') that annealed 135 bp downstream from the insertional sequence IS50L of Tn5-*gusA*. The sequence of the Tn5 insertional site was compared with the 55,839-bp sequence containing XALB1 and with the 2,986-bp sequence containing XALB2 in order to determine the *alb* gene disrupted in each *Tox⁻* mutant.

LITERATURE CITED

- Admiraal, S. J., Walsh, C. T., and Khosla, C. 2001. The loading module of rifamycin synthetase is an adenylation-thiolation domain with substrate tolerance for substituted benzoates. *Biochemistry* 40:6116-6123.
- Albertini, A. M., Caramori, T., Scoffone, F., Scotti, C., and Galizzi, A. 1995. Sequence around the 159 degree region of the *Bacillus subtilis* genome: The *pksX* locus spans 33.6 kb. *Microbiology* 141:299-309.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- August, P. R., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Muller, R., Yu, T. W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C. G., Zhang, X., Hutchinson, C. R., and Floss, H. G. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: Deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* 5:69-79.
- Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* 2:1-11.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1983. The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. *Phytopathology* 73:1368-1374.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1985a. June 1985. Antibiotic and process for the production thereof. U. S. patent 4,525,354.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1985b. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1069-1075.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987a. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:199-206.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987b. Evidence that an albicidin-like phytoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* 30:207-214.
- Brady, S. F., Chao, C. J., and Clardy, J. 2002. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 124:9968-9969.
- Brendel, V., and Trifonov, E. N. 1984. A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators. *Nucleic Acids Res.* 12:4411-4427.
- Cane, D. E. 1997. A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. *Chem. Rev.* 97:2463-2706.
- Cane, D. E., and Walsh, C. T. 1999. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6:319-325.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., and Khosla, C. 1998. Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science* 282:63-68.
- Challis, G. L., Ravel, J., and Townsend, C. A. 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* 7:211-224.
- Cheng, Y. Q., Tang, G. L., and Shen, B. 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:3149-3154.
- De Feyter, R., and Gabriel, D. W. 1991. Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xan-*

- thomonas campestris* pv. *malvacearum*. J. Bacteriol. 173:336-342.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., and Shen, B. 2000. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. Chem. Biol. 7:623-642.
- Du, L., and Shen, B. 2001. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. Curr. Opin. Drug Discovery Dev. 4:215-218.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., and Vater, J. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:13294-13299.
- Gabriel, D. W., and De Feyter, R. 1992. RFLP analyses and gene tagging for bacterial identification and taxonomy. Pages 51-66 in: Molecular Plant Pathology, Volume II: A Practical Approach. S. J. Gurr, M. J. McPherson, and D. J. Bowles, eds. IRL Press, Oxford.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C., and Grandi, G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. J. Biol. Chem. 273:32857-32863.
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. G. 2000a. Analysis of the genes flanking *xabB*: A methyltransferase gene is involved in albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. Gene 255:327-333.
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. G. 2000b. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. Gene 258:193-199.
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. G. 2001. A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. Microbiology 147:631-642.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M. A. 1997. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC10716: Molecular characterization of three multi-modular peptide synthetase. Chem. Biol. 4:927-937.
- Leong, S. A., Diitta, G. S., and Helinski, D. R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*: Identification of a cloned gene coding for aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. 257:8724-8730.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., and Mootz, H. D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev. 97:2651-2673.
- May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A., and Stubbs, M. T. 2002. Crystal structure of Dhbe, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12120-12125.
- Mayorga, M. E., and Timberlake, W. E. 1992. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wa* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthetases. Mol. Gen. Genet. 235:205-212.
- Paitan, Y., Orr, E., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. 1999. Genetic and functional analysis of genes required for the post-modification of the polyketide antibiotic TA of *Mycrococcus xanthus*. Microbiology 145:3059-3067.
- Piel, J. 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:14002-14007.
- Ricaud, C., and Ryan, C. C. 1989. Leaf scald. Pages 39-58 in: Diseases of Sugarcane: Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie, Jr., and C. G. Hughes, eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Rott, P., Abel, M., Soupa, D., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1994. Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic resistant mutant. Plant Dis. 78:241-247.
- Rott, P. C., Costet, L., Davis, M. J., Frutos, R., and Gabriel D. W. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. J. Bacteriol. 178:4590-4596.
- Rott, P., and Davis, M. J. 2000. Leaf scald. Pages 38-44 in: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally, eds. Cirad/Assct, Montpellier, France.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5467.
- Scholz-Schroeder, B. K., Soule, J. D., and Gross D. C. 2003. The *sypA*, *sypB*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:271-280.
- Scholz-Schroeder, B. K., Soule, J. D., Lu, S. E., Grgurina, I., and Gross D. C. 2001. A physical map of the syringomycin and syringopeptin gene clusters localized to an approximately 145-kb DNA region of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D. Mol. Plant-Microbe Interact. 14:1426-1435.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem. Biol. 6:493-505.
- Stahl, E., ed. 1969. Pages 8555-8909 in: Thin-Layer Chromatography. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Takano, Y., Kubo, Y., Shimizu, K., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. 1995. Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. Mol. Gen. Genet. 249:162-167.
- von Döhren, H., Dieckmann, R., and Pavela-Vrancic, M. 1999. The nonribosomal code. Chem. Biol. 6:273-279.
- Wall, M. K., and Birch, R. G. 1997. Genes for albicidin biosynthesis and resistance span at least 69 kb in the genome of *Xanthomonas albilineans*. Lett. Appl. Microbiol. 24:256-260.
- Yu, J. H., and Leonard, T. J. 1995. Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. J. Bacteriol. 177:4792-4800.
- Yu, S., Fiss, E., and Jacobs, W. R. 1998. Analysis of the exochelin locus in *Mycobacterium smegmatis*: Biosynthesis genes have homology with genes of the peptide synthetase family. J. Bacteriol. 180:4676-4685.
- Zhang, L., and Birch, R. G. 1997. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:9984-9989.
- Zhang, L., Xu, J., and Birch, R. G. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. Nat. Biotechnol. 17:1021-1024.
- Zhu, G., LaGier, M. J., Stejskal, F., Millership, J. J., Cai, X., and Keithly, J. S. 2002. *Cryptosporidium parvum*: The first protist known to encode a putative polyketide synthase. Gene 298:79-89.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- Challis and associates' NRPS prediction blast server: jhunix.hcf.jhu.edu/~ravel/nrps/
- National Center for Biotechnology website: www.ncbi.nlm.nih.gov/

CHAPITRE III :

**CARACTERISATION DE LA REGION GENOMIQUE XALB3 IMPLIQUEE
DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ALBICIDINE**

Résumé

Les études de mutagenèse insertionnelle antérieures ont révélé qu'au moins deux régions du génome de *X. albilineans* sont impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. La plus grande région identifiée, XALB1, contient 20 ORFs dont trois codent pour des mégasynthétases présentant une architecture typique des NRPS et PKS. Une seconde région, XALB2, contient un seul gène codant pour une phosphopantéthéinyl transférase. Cette enzyme est requise pour la modification post traductionnelle et l'activation des PKS et des NRPS. Ce chapitre traite de la caractérisation de la troisième région du génome de *X. albilineans* impliquée dans la biosynthèse d'albicidine, XALB3. La région XALB3 a été sous-clonée et séquencée. Elle comporte un seul gène, *albXXII*, impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine. Ce gène code pour une protéine de 634 acides aminés, désignée AlbXXII, présentant un degré d'homologie élevé (60% d'identité) avec une chaperonne d'*E. coli*, la protéine de choc thermique HtpG. Des études de complémentation fonctionnelle ont permis de confirmer l'implication d'AlbXXII dans la biosynthèse de l'albicidine et de révéler son interchangeabilité fonctionnelle avec le gène *HtpG* d'*E. coli*. La protéine HtpG de *X. albilineans* et l'albicidine ont été localisées de façon conjointe au niveau de la membrane bactérienne, fraction cellulaire où la toxine est probablement synthétisée.

1 Introduction

Parmi les trois régions génomiques impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine précédemment identifiées, seule la troisième région (XALB3) demeurait non caractérisée. Le séquençage de cette région a permis de mettre en évidence un nouveau gène impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine chez *X. albilineans*. Ce gène code pour une protéine de 634 acides aminés qui a été désignée AlbXXII dans un premier temps. AlbXXII présente un degré d'homologie élevé (60% d'identité) avec une chaperonne d'*E. coli*, la protéine de choc thermique HtpG. Des études de complémentation fonctionnelles ont permis de confirmer l'implication d'AlbXXII dans la biosynthèse de l'albicidine et ont révélé son interchangeabilité fonctionnelle avec le gène *HtpG* d'*E. coli*. AlbXXII a donc été renommée HtpG de *X. albilineans*. Nous détaillerons ici les différents types de chaperonnes bactériennes avec une attention plus particulière pour les protéines de choc thermique, et notamment l'HtpG qui est l'homologue procaryote de la protéine eucaryote Hsp90.

1.1 Chaperonnes bactériennes

Le repliement des protéines dans la cellule a longtemps été considéré comme un processus spontané, alors que dans de nombreux cas, ce repliement requiert l'intervention de chaperonnes moléculaires. Le terme chaperonne moléculaire est apparu pour la première fois sous la plume de R. Laskey (1978) pour décrire la capacité de la nucléoplasmine à solubiliser *in vitro* les nucléosomes obtenus en mélangeant de l'ADN avec des histones. Une définition plus récente est donnée par Ellis (1993) : " Les chaperonnes sont définies comme étant des molécules appartenant à une classe fonctionnelle de protéines sans relations les unes avec les autres, et dont le rôle est d'assister à l'assemblage *in vivo* d'autres structures comportant des polypeptides, et sans faire partie de ces structures dès que celles-ci remplissent leur fonction biologique normale ". Cette définition est en accord avec les diverses fonctions que les protéines chaperonnes assurent dans la cellule. Elles sont impliquées dans la sécrétion, elles protègent les protéines cellulaires contre les choc thermiques, elles participent à la réparation des protéines mal repliées ou endommagées par des conditions de stress, et enfin, elles participent activement à l'équilibre entre dégradation protéolytique et repliement des protéines cellulaires. Le

très haut niveau de conservation de ces protéines a permis de les classer sur la base de leur phylogénie. Nous nous intéresserons ici aux chaperonnes d'*E. coli* les mieux caractérisées : GroE et DnaK/DnaJ, puis aux autres chaperonnes et à leur fonction dans la cellule, avec une attention particulière pour HtpG, dont l'homologue chez *X. albilineans* est impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine et fait l'objet de ce chapitre.

1.1.1 GroE

Les chaperonnes appartenant à cette famille ont été découvertes en étudiant des mutants du gène *rpoH* d'*E. coli* dont la croissance est inhibée au delà de 20°C. La mise en culture de ces mutants thermosensibles à des températures supérieures à 20°C a permis de sélectionner des mutants capables de compenser la mutation de *rpoH*. Ces mutants étaient des mutants du promoteur de l'opéron GroE surexprimant les deux gènes de l'opéron : *GroES* et *GroEL* (Kusukawa, 1988). De nombreux travaux (cf. synthèse de Walter, 2002) ont permis de décrire les mécanismes de fonctionnement du système GroE qui est devenu un système modèle pour le fonctionnement des chaperonnes dans le repliement des protéines. D'après ce modèle, le système GroE procède selon un cycle à trois étapes. Il est composé de deux complexes GroEL-GroES qui sont superposés. GroEL a la structure d'un anneau et GroES est placé au dessus de GroEL à la manière d'un couvercle. Le substrat polypeptidique est capturé par la protéine GroEL, puis est transféré à l'intérieur de l'anneau avec fixation concomitante de la protéine GroES et d'ATP. L'intérieur de l'anneau constitue un micro-environnement favorable au repliement du polypeptide qui prend alors sa conformation native. Le polypeptide est ensuite relargué dans l'environnement après hydrolyse de l'ATP, ce qui a pour effet de régénérer le complexe GroE sous sa forme acceptrice (couvercle ouvert).

1.1.2 DnaK/DnaJ

Ce second système de chaperonnes d'*E. coli* a été découvert en poursuivant les expériences de Kusukawa (1988) et en tentant de faire pousser les mutants surexprimant l'opéron *GroE* à des températures supérieures à 40°C. Une seconde série de mutants d'expression, surexprimant l'opéron *DnaK*, a alors été identifiée. Le complexe DnaK/DnaJ, qui requiert également la protéine GroE pour son fonctionnement, est l'équivalent procaryote des Hsp70 eucaryotes. Cette famille de

chaperonnes est retrouvée dans tous les règnes avec un niveau de conservation élevé, ce qui dénote une pression de sélection accrue sur ces protéines. Le domaine J de la protéine DnaJ est retrouvé chez de nombreuses protéines interagissant avec les Hsp70. Le fonctionnement du système DnaK/DnaJ est plus complexe à analyser que celui du système GroE, en particulier à cause de la propension du système DnaK/DnaJ à interagir avec d'autres chaperonnes cellulaires. Un modèle de fonctionnement du système DnaK/DnaJ a néanmoins émergé (Beissinger & Buchner, 1998). Brièvement, le substrat (ou plus précisément un motif protéique provenant d'une protéine mal repliée) se lie à un complexe DnaK-ATP (éventuellement via la protéine DnaJ). Il s'en suit une hydrolyse de l'ATP, qui induit une augmentation de l'affinité de la protéine DnaK pour le motif peptidique qu'elle lie. La protéine GroE intervient alors en remplaçant l'ADP par de l'ATP ce qui a pour effet de diminuer l'affinité de DnaK pour son peptide client et aboutit à la dissociation du complexe. La fonction du complexe, dont le point clé est l'équilibre entre association et dissociation avec le peptide client, est de protéger celle-ci d'une agrégation avec des régions présentant de mauvais repliements similaires. De par leur mode de fonctionnement, les chaperonnes de type DnaK/DnaJ sont de bonnes candidates pour jouer un rôle dans le repliement des protéines en cours de synthèse et dans leur protection contre l'agrégation et le mauvais repliement (Lund, 2001). Le séquençage des génomes d'*E. coli* et d'autres bactéries a permis de mettre en évidence des protéines homologues aux protéines DnaK et DnaJ (deux homologues de DnaK et cinq de DnaJ) dont la fonction n'a pas été précisément caractérisée. Néanmoins, ces homologues possèderaient une activité chaperonne spécialisée et restreinte à certaines voies métaboliques.

1.1.3 Les autres chaperonnes procaryotes et leur fonction

Les systèmes que nous présenterons dans cette section jouent un rôle chez *E. coli* et dans d'autres systèmes procaryotes, mais ces systèmes ont été nettement moins étudiés que les deux systèmes décrits précédemment. La plupart des chaperonnes décrites sont des protéines de choc thermique, à l'exception des chaperonnes impliquées dans les systèmes de sécrétion.

1.1.3.1 IbpA et IbpB

Ces protéines appartiennent à la famille des petites protéines de choc thermique, initialement découvertes associées aux corps d'inclusion. IbpA et IbpB rentrent majoritairement dans la composition de la fraction des protéines agrégées suite à un choc thermique (Laskowska *et al.*, 1996). La fonction de ces protéines demeure inconnue bien que des expériences *in vitro* aient démontré leur capacité à se lier à des protéines dénaturées par la chaleur, à prévenir leur agrégation et à les diriger vers les systèmes DnaK ou Clp (voir ci-après).

1.1.3.2 Les protéases Clp

La gestion des protéines dénaturées par la cellule implique l'existence d'un équilibre entre dégradation protéolytique et renaturation. Ainsi, un certain nombre de protéases possèdent une fonction chaperon. C'est le cas des complexes de protéases ATP dépendantes ClpP-ClpA/ClpX. Dans ce cas, la sous-unité ClpP qui présente une structure en anneau rappelant la structure de GroEL possède l'activité protéolytique. ClpP n'est active que sur des substrats ayant préalablement été déroulés par l'activité chaperonne de ClpA ou de ClpX (Poriankiewicz *et al.*, 1999).

1.1.3.3 Le système SecB

Les protéines devant être sécrétées doivent être maintenues dans un état de non repliement leur permettant de franchir la barrière que constitue la membrane cellulaire. Dans le même temps, ces protéines doivent être protégées des interactions avec d'autres protéines qui risqueraient de provoquer leur agrégation. C'est ce rôle que jouent les chaperonnes de type SecB. SecB se lie à la chaîne polypeptidique en cours de biosynthèse et maintient la protéine dans une conformation compatible avec la translocation membranaire médiée par un peptide signal (Lecker *et al.*, 1990). La protéine SecB est affine avec la protéine SecA du complexe de translocation transmembranaire et va par conséquent diriger sa protéine client vers SecA. Une fois le processus de translocation membranaire de la protéine client initié, SecB est libérée et peut se fixer sur une nouvelle protéine client (Fekkes *et al.*, 1997).

1.1.3.4 SRP, "Signal Recognition Particle"

Ce système, composé d'un ARN de 4,5S et d'une protéine de 48kDa, est une chaperonne au sens où nous l'avons défini ci dessus. Ce complexe se fixe à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et dirige celle-ci, encore liée au ribosome, vers une protéine récepteur, FtsY. Une fois le complexe au niveau de la membrane, SRP est libérée (aux dépens d'un GTP) et la chaîne polypeptidique est sécrétée (Luirink *et al.*, 1994).

1.1.3.5 HtpG

E. coli exprime une protéine, HtpG pour "Heat shock protein G", qui est l'homologue procaryote de la protéine eucaryote Hsp90. En conséquence elle appartient à cette superfamille de protéines chaperonnes. Le rôle *in vivo* d'HtpG demeure inconnu alors que de nombreuses études ont démontré le rôle de chaperonne d'Hsp90 ainsi que son implication dans la signalisation cellulaire. Des données préliminaires ont cependant permis de démontrer qu'HtpG jouait un rôle dans le repliement *de novo* de protéines ayant subi des conditions de stress. Cette fonction d'HtpG se ferait via une potentialisation des chaperonnes de type DnaK-DnaJ-GroE (Thomas & Banneyx, 2000) et une facilitation des interactions de ce système chaperon avec les protéines néo-synthétisées. A l'inverse des Hsp90 de la drosophile et de la levure dont la délétion est létale, la délétion d'HtpG n'a pas d'effet sur la viabilité d'*E. Coli* si ce n'est une augmentation de la sensibilité du mutant aux chocs thermiques (Bardwell & Craig, 1988).

D'un point de vue structural, les membres de la famille Hsp90 présentent une structure conservée, avec un domaine aminoterminal de liaison à l'ATP de 25 kDa, un domaine central d'environ 35kDa comportant peu de résidus chargés (en comparaison du domaine de liaison à l'ATP) et un domaine de 12 kDa responsable de l'homodimérisation de la chaperonne (Yamada, 2003).

Le domaine aminoterminal de liaison à l'ATP a été caractérisé pour l'Hsp82 de *Saccharomyces cerevisiae* (l'homologue de Hsp90 et de HtpG chez la levure) par mutagenèse dirigée puis par cristallographie (Prodromou *et al.*, 1997a et b; Stebbins, 1997; Nemoto *et al.*, 2001). Ce domaine est largement conservé, en particulier le site de fixation du nucléotide qui présente deux résidus invariants : le glutamate 33 (responsable de l'interaction avec l'ion Mg⁺⁺) et l'aspartate 79 (responsable de

l'interaction avec l'adénine) (Panaretou *et al.*, 1998). Les études *in vitro* d'HtpG sont compliquées car cette protéine n'est active *in vitro* que sous forme oligomérique. Cette forme ne peut être obtenue que par traitement à la chaleur (70°C, 5 min.) en présence d'un substrat protéique approprié (Nemoto *et al.*, 2001).

A la différence des données bibliographiques disponibles sur HtpG, une masse impressionnante de publications existe sur son homologue eucaryote, Hsp90 (en particulier l'Hsp90 humaine) qui est une cible thérapeutique du cancer. Hsp90 joue un rôle prédominant dans le maintien de la transformation de la cellule et dans la régulation de protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose, à la survie ou à la division cellulaire (Chiosis *et al.*, 2004).

2 Résultats

Parmi les trois régions génomiques impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine précédemment identifiées, seule la région XALB3 demeurait non caractérisée. Le séquençage de cette région a permis de mettre en évidence un gène impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine chez *X. albilineans*. Ce gène code pour une protéine présentant un degré d'homologie élevé (60% d'identité) avec une chaperonne d'*E. coli*, la protéine de choc thermique HtpG. La confirmation de l'implication d'AlbXXII dans la biosynthèse de l'albicidine a été obtenue par complémentation fonctionnelle avec les gènes *albXXII* de *X. albilineans* et *HtpG* d'*E. coli*. AlbXXII a donc été renommée HtpG de *X. albilineans*. Ces résultats ont conduit à la publication d'un article dans FEMS Microbiology Letters. Cet article est présenté ci dessous. Bien que l'implication d'HtpG dans la biosynthèse de l'albicidine ait été formellement démontrée, sa fonction précise demeure néanmoins inconnue. Des expériences de double hybride ont par conséquent été réalisées chez *E. coli* avec la technique Bacteriomatch[®] II (Stratagene), afin d'identifier la protéine interagissant avec HtpG de *X. albilineans*. Plusieurs banques *Sau3AI* ont été générées à partir d'ADN génomique de *X. albilineans*, ainsi qu'à partir de constructions comportant l'intégralité des gènes de biosynthèse de l'albicidine. Ces banques ont été criblées avec le système double hybride en utilisant HtpG comme cible. Seuls deux peptides de 12 acides aminés appartenant aux protéines AlbVI et AlbII (deux O-Methyltransférases identifiées dans la région XALB1, Royer *et al.*, 2004) ont ainsi été identifiés. Cependant, l'interaction entre la protéine AlbVI entière et HtpG n'a pas été



confirmée en double hybride. De même, l'interaction entre HtpG et les protéines AlblI ou AlblVI n'a pas pu être mise en évidence au niveau biochimique (Pull down et Far Western blot).

D'autre part, des constructions codant pour un fragment de 4648 acides aminés de la protéine AlblI (correspondant aux domaines ACP1 à NRPS4 ; Royer *et al.*, 2004) ou pour les domaines d'adénylation des modules NRPS2, NRPS3 ou NRPS5 ont été générées et testées dans le même système double hybride. Ces tentatives d'identification sont cependant demeurées infructueuses. Enfin, des expériences de fractionnement sub cellulaire ont permis de localiser la protéine HtpG de *X. albilineans* et l'albicidine de façon conjointe au niveau de la membrane cellulaire, site probable de la biosynthèse de la toxine.



ELSEVIER

FEMS Microbiology Letters xxx (2005) xxx–xxx

FEMS
MICROBIOLOGY
Letters

www.fems-microbiology.org

Xanthomonas albilineans HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin

Eric Vivien^a, Sandrine Megessier^a, Isabelle Pieretti^a, Stéphane Cociancich^a, Roger Frutos^a, Dean W. Gabriel^b, Philippe C. Rott^a, Monique Royer^{a,*}

^a Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, UMR 385 BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 411K, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA

Received 14 April 2005; received in revised form 19 July 2005; accepted 22 July 2005

First published online

Edited by J.A. Gil

Abstract

Xanthomonas albilineans, the causal agent of leaf scald disease of sugarcane, produces a highly potent polyketide-peptide antibiotic and phytotoxin called albicidin. Previous studies established the involvement of a large cluster of genes in the biosynthesis of this toxin. We report here the sub-cloning and sequencing of an additional gene outside of the main cluster and essential for albicidin biosynthesis. This gene encodes a 634-amino-acid protein that shows high identity with the *Escherichia coli* heat shock protein HtpG. Complementation studies of *X. albilineans* *Tox*⁻ mutants confirmed the requirement of *htpG* for albicidin biosynthesis and revealed functional interchangeability between *E. coli* and *X. albilineans* *htpG* genes. HtpG was co-localised with albicidin in the cellular membrane, i.e., the cellular fraction where the toxin is most probably synthesised. Here we show the requirement of an HtpG protein for the biosynthesis of a polyketide-peptide antibiotic.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

Keywords: Leaf scald; Nonribosomal peptide synthetases; Polyketide synthases; Sugarcane

1. Introduction

Xanthomonas albilineans is a systemic, xylem-invasive, slow growing, Gram-negative bacterium that causes leaf scald disease of sugarcane (interspecific hybrids of *Saccharum* species) [1]. Leaf scald symptoms include chlorosis, necrosis, rapid wilting, and plant death. Chlorosis-inducing strains of the pathogen produce several toxic compounds. The major toxic component, named albicidin, plays a key role in pathogenesis [2]; it inhibits

chloroplast DNA replication, resulting in blocked chloroplast differentiation and appearance of chlorotic leaf streaks that are characteristic of the disease [3]. Albicidin also inhibits prokaryotic DNA replication and is bactericidal to a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria [4]; this compound is, therefore, of interest as a potential clinical antibiotic. Although the chemical structure of albicidin remains unknown, it has been partially characterised as a polyketide-peptide antibiotic with a molecular weight of about 842 Da [4].

Transposon mutagenesis study revealed that at least two separate genomic regions are involved in albicidin production by *X. albilineans* [5]. Among a total of 50 generated albicidin deficient mutants, 45 were localized

* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 62 48 44; fax: +33 4 99 62 48 08.

E-mail address: monique.royer@cirad.fr (M. Royer).

in region XALB1. This region contains 20 ORFs including three major genes with a modular architecture characteristic of polyketide synthases (PKSs) and non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), as well as several putative resistance, regulatory and modifying genes [6,7]. NRPSs synthesise peptides by condensation of individual amino-acid or amino-acid analogs in a biosynthetic pathway that does not involve ribosomes [8]. Based on *in silico* analyses of the albicidin PKSs and NRPSs, an albicidin biosynthesis pathway has been proposed [7]. Two other mutants were located in XALB2, a region containing only one gene coding for a phospho-pantetheinyl transferase. This enzyme is required for post-translational activation of albicidin PKS and NRPS enzymes [7,9]. Three additional mutants, XaAM12, XaAM13 and XaAM36, were complemented by a cosmid, pALB639 (Table 1) that did not cross hybridise with cosmids containing XALB1 or XALB2 [5].

We report here the subcloning, sequencing and homology analysis of a third region involved in albicidin biosynthesis, XALB3, present in cosmid pALB639.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The source of bacterial strains and their relevant characteristics are described in Table 1. *X. albilineans* and *E. coli* culture conditions and bacterial conjugation have been described elsewhere [5,10].

2.2. Albicidin detection assay

Albicidin was detected by a microbiological assay as described previously [5]. Alternatively, liquid culture media, lysates or cell fractions were spotted on LB plates overlaid with a top agar containing a suspension of *E. coli* susceptible to albicidin. Albicidin was quantified with a bioassay, using the following formula [11]: free albicidin (ng/ml) = $4.576 e^{(0.315 \times \text{Inhibition zone diameter in mm})}$.

2.3. Nucleic acid manipulations, oligonucleotide synthesis and DNA sequencing

Standard molecular techniques were used to manipulate DNA [10] except that *X. albilineans* total genomic DNA was prepared for Southern blot hybridisation as described by Gabriel and De Feyter [12]. Automated DNA sequencing was performed by Genome Express (Grenoble or Montreuil, France). Sequence analyses were carried out using Sequence Navigator™ (Applied Biosystems, Inc.) and SeqMan (DNASTAR Inc.) programs.

2.4. Sequencing of the Tn5 insertional site of *Tox*⁻ mutants located in XALB3 and sequencing of the genomic region XALB3

The complete double-strand nucleotide sequence of the 9673 bp *EcoRI*–*Sau3AI* genomic fragment, subcloned into pALB639A, was determined by sequencing pAM12.1, pAM36.2 and pALB639A (Fig. 1; GenBank Accession No. AM039979). The Tn5 insertional site of mutants XaAM12 and XaAM36 was determined by sequencing pAM12.1 and pAM36.2, respectively (Table 1 and [5]), using primer GUSN (Table 1) that annealed 135 bp downstream from the insertional sequence IS50L of Tn5-*gusA*. Tn5 transposon insertion site could not be determined in mutant XaAM13 because, for unknown reasons, subcloning and PCR amplification of the Tn5 flanking region were unsuccessful.

2.5. Sequences analysis

Nucleotide sequences were translated in all six reading frames using EditSeq (DNASTAR Inc.). Potential products of ORFs longer than 100 bases were compared to protein databases using the PSI-BLAST program [13] on the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequences were aligned using the Megalign Software (DNASTAR Inc.). The TERMINATOR program [14], run with the Wisconsin Package™ GCG software (Accelrys, San Diego, CA) was used to identify putative Rho-independent transcription terminators. *In silico* cellular localisation was predicted using the PSORT software [15] on the PSORT web server (<http://psort.nibb.ac.jp>).

2.6. Mapping of the *X. albilineans* htpG transcription initiation

Total RNA was extracted from 2-day-old cultures of *X. albilineans* Xa23RI using Master complete RNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations, except that cells were initially resuspended in RNA protect Bacteria reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France). 5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE) was subsequently performed with the 5'/3' RACE kit (Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's recommendations and with oligonucleotides RACE22a, RACE22b and RACE22c, that anneal 363, 266 and 176 bases downstream from the *htpG* ATG, respectively (Table 1). The resulting PCR product was sequenced using oligonucleotide RACE22c.

2.7. Subcloning of the *X. albilineans* htpG gene

The *SaI* DNA fragment corresponding to the XALB3 DNA region from nucleotide 5510 to nucleotide

Table 1
Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strains, plasmids or oligonucleotides	Relevant characteristics ^a	Reference or source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- β 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_l⁻ m_r⁻</i>) supE44 thi-1 <i>gyrA96 relA1</i>	Gibco-BRL
<i>Xanthomonas albilineans</i>		
Xa23	Wild type from sugarcane (Florida)	[5]
Xa23R1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xa23	[5]
XaAM10	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> in XALB2, Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	[5]
XaAM12	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> in XALB3, Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	[5]
XaAM13	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> in XALB3, Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	[5]
XaAM15	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> in XALB1, Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	[5]
XaAM36	Xa23R1::Tn5- <i>gusA</i> in XALB3 Km ^r , Rif ^r , Tox ⁻	[5]
Plasmids		
pBR325	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	Gibco-BRL
pGEMT	Ap ^r	Promega
pRK2073	pRK2013 derivative, Km ^r (<i>npt</i> ::Tn7), Sp ^r , Tra ⁺ , helper plasmid	Cited in [5]
pUFR043	IncW, Mob ⁺ , <i>LacZα</i> , Gm ^r , Km ^r , Cos	Cited in [5]
pALB639	36-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	[5]
pALB 540	47-kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	[5]
pAM12.1	11kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM12 in pBR325, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	[5]
pAM36.2	8-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5 and flanking sequences of mutant XaAM36 in pBR325, Km ^r , Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	[5]
pALB639A	9.7-kb <i>EcoRI-Sau3AI</i> insert from pALB639 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pEV639	2.6-kb <i>SalI</i> insert from pALB639A in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pGEMTalbHtpG	1948 bp PCR insert from Xa23R1 in pGEMT, Ap ^r	This study
pGEMTalbHtpG bis	<i>X. albilineans htpG</i> ORF plus 111bp downstream from stop codon in pGEMT, Ap ^r	This study
pGEMTcolHtpG	2343 bp PCR insert from DH5 α in pGEMT, Ap ^r	This study
pAlbH	<i>X. albilineans htpG</i> in fusion with <i>lacZ</i> in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
pHisAlbH	Hexa histidine tag in fusion with <i>X. albilineans htpG</i> in pAlbH, Gm ^r , Km ^r	This study
pColH	<i>E. coli htpG</i> in fusion with <i>lacZ</i> in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	This study
Oligonucleotides		
GUSN	5'tgccacacagccgctcagat3'	Genome express
alb22F	5'tttgaattcgcacctaccgatgagcgtgg3'	Genome express
alb22R	5'tttggatccgtgcgtcaactgcattaccg3'	Genome express
RACE22a	5'gtgcgaatcctctctgatc3'	Genome express
RACE22b	5'ctcatgccgatgccgttgctg3'	Genome express
RACE22c	5'tccagaagtccgcttgacc3'	Genome express
ColHTF	5'tttgaattccatgaaaggacaagaactcgtgg3'	Genome express
ColHTR	5'gcctgcggaatggtacgcgggaagccgtcc3'	Genome express
HistagalbhtpgF	5'aattgcgtgcaccacatcaacatcacca13'	Genome express
HistagalbhtpgR	5'aattatggtgatggtgatggtgcgac3'	Genome express

Tox⁻: deficient in albicidin production.

^a Ap^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Rif^r, Sp^r, Tc^r: resistant to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, rifampicin, spectinomycin, tetracycline, respectively.

8124, was subcloned into pUFR043 in the opposite direction to the promoter of the *lacZ* operon, yielding plasmid pEV639 (Table 1 and Fig. 1). Simultaneously, a 1948 bp fragment corresponding only to the 1905 bp ORF of *htpG* was PCR-amplified from cosmid pALB639A with primers alb22F and alb22R (Table 1). The PCR fragment was cloned into pGEMT (Promega) and several clones of the resulting plasmid pGEMT/albHtpG were sequenced. Plasmid pGEMT/albHtpGbis contained an insert corresponding to the intact *htpG* ORF plus 111 bp downstream from the

stop codon. This insert was then directionally subcloned as an *EcoRI-SalI* fragment into pUFR043 to drive transcription of *htpG* from the promoter of the *lacZ* operon of the vector. The resulting construct, pAlbH, together with pEV639, were used for complementation studies.

2.8. Cloning of the *E. coli htpG* gene

A 2343 bp fragment containing *htpG* from *E. coli* was PCR amplified from purified DH5 α genomic DNA with

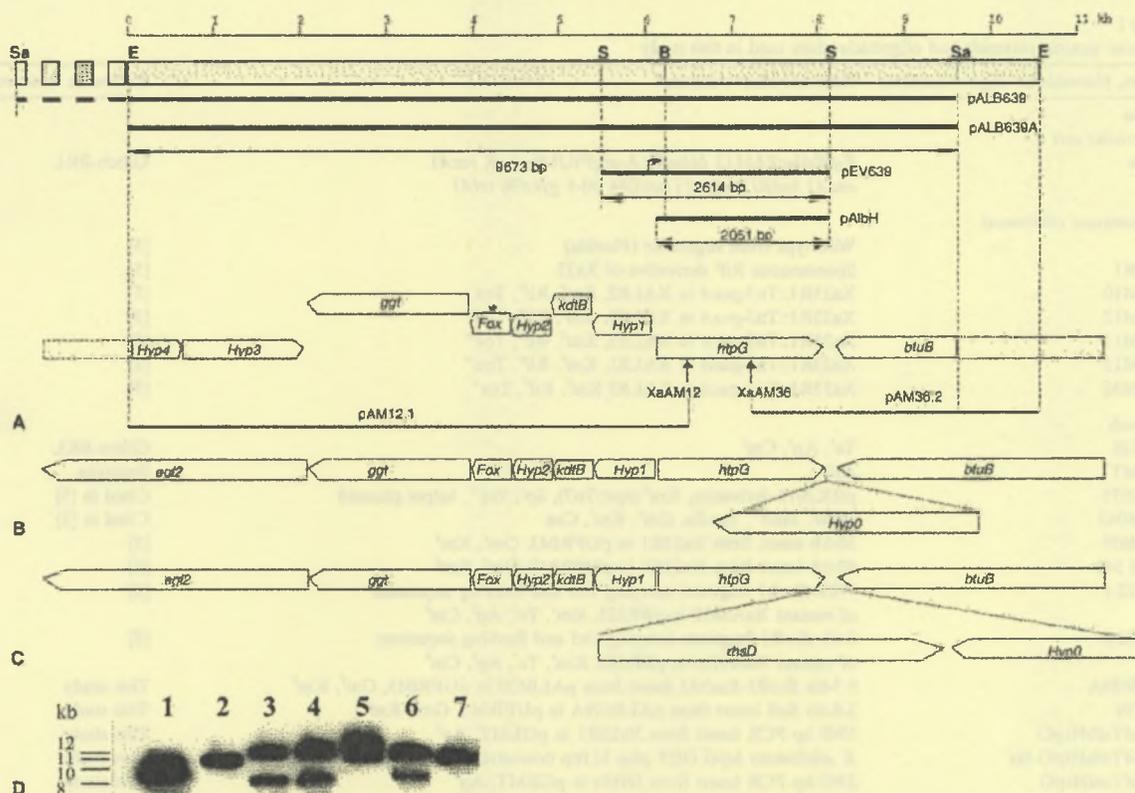


Fig. 1. Physical map and genetic organisation of DNA fragments containing the *htpG* gene in different xanthomonads. (A) Physical map and genetic organisation of the DNA fragment containing the genomic region XALB3 involved in albicidin production. The shaded box at the top of the figure represents the XALB3 genomic region. E, B, S and Sa are restriction sites used for subcloning of XALB3 and *Xanthomonas albilineans htpG*; they are for *EcoRI*, *BglII*, *Sall* and *Sau3AI*, respectively. The DNA inserts carried by plasmids pALB639, pALB639A, pEV639 and pAlbH are represented by thick bars at the top of the figure. Position of the Tn5 insertional sites of mutants XaAM12 and XaAM36 are indicated by vertical arrows. The DNA regions corresponding to Tn5 flanking sequences in pAM12.1 and pAM36.2 are represented by the bars at the bottom of the figure. The location and direction of *htpG* and of the surrounding ORFs are indicated by the thick arrows. The transcription initiation site of *htpG* is indicated by a broken arrow on pEV639. Proposed functions from left to right: *Hyp4* and *Hyp3*: Hypothetical proteins related to *Caulobacter crescentus* Hypothetical proteins AAK22542 and AAK22541, respectively, *ggf*: Gamma-glutamyltranspeptidase, *Fox**: interrupted ferredoxin ORF, *Hyp2*: Hypothetical protein, *kdtB*: lipopolysaccharide synthesis enzyme, *Hyp1*: Hypothetical protein, and *btuB*: TonB dependent receptor. (B) Physical map and genetic organisation of the DNA fragment containing the *htpG* gene in *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. From left to right: *egl2*: Cellulase (AAM41665), *ggf*: Gamma-glutamyltranspeptidase (AAM41666), *Fox*: Ferredoxin (AAM41667), *Hyp2*: Hypothetical protein XCC2390 (AAM41668), *kdtB*: lipopolysaccharide synthesis enzyme (AAM41669), *Hyp1*: Hypothetical protein XCC2392 (AAM41670), *htpG*: Heat shock protein G (AAM41671), *Hyp0*: Hypothetical protein XCC2394 (AAM41672) and *btuB*: TonB dependent receptor (AAM41673). (C) Physical map and genetic organisation of the DNA fragments containing the *htpG* gene in *X. axonopodis* pv. *citri* ATCC 306. From left to right: *egl2*: Cellulase (AAM37373), *ggf*: Gamma-glutamyltranspeptidase (AAM37374), *Fox*: Ferredoxin (AAM37375), *Hyp2*: Hypothetical protein XAC2525 (AAM37376), *kdtB*: lipopolysaccharide synthesis enzyme (AAM37377), *Hyp1*: Hypothetical protein XAC2527 (AAM37378), *htpG*: Heat shock protein G (AAM37379), *RhsD*: RhsD protein (AAM37380), *Hyp0*: Hypothetical protein XAC2530 (AAM37381) and *btuB*: TonB dependent receptor (AAM37382). (D) Southern blot analysis of *EcoRI* digest of pALB639 (lane 1), and of total genomic DNA from *Tox*⁻ mutants XaAM10 (lane 2), XaAM12 (lane 3), XaAM13 (lane 4), XaAM15 (lane 5), XaAM36 (lane 6) and Xa23R1 (lane 7) using pALB639A as a probe. The approximate size (in kb) of the different bands is indicated on the left of the lanes. The double band of lane 1 corresponds to the pUFR043 vector derived band and the 10 kb XALB3 *EcoRI*-*Sau3AI* subgenomic fragment of pALB639 (the *EcoRI* restriction site located downstream from *Sau3AI* in pALB639 originates from the pUFR043 vector cassette). The 11 kb band in Xa23R1 (lane 7) corresponds to the XALB3 *EcoRI* subgenomic fragment. As expected, the same *EcoRI* 11 kb band was found in XALB1 mutant (lane 5) and in XALB2 mutant (lane 2). The two bands of 8 and 12 kb, that hybridised in XALB3 mutants (lanes 3, 4 and 6), resulted from the digestion of the *EcoRI* restriction site present in the 9 kb Tn5 transposon.

primers ColHTF and ColHTR (Table 1). PCR fragment was cloned into pGEMT, sequenced, and subcloned as an *EcoRI*-*Sall* fragment into pUFR043. The resulting

clone, pColH, carrying *htpG* driven by the promoter of the *lacZ* operon, was used for complementation studies (Table 2).

Table 2
Complementation studies of insertion mutants of *Xanthomonas albilineans* Xa23R1

Donor	Recipient or Tox ⁻ mutant (Genomic region)				
	XaAM12 (XALB3)	XaAM13 (XALB3)	XaAM36 (XALB3)	XaAM10 (XALB2)	XaAM15 (XALB1)
pEV639	+	+	+	-	-
pAlbH	+	+	+	-	-
pColH	+	+	+	-	-
pALB639A	+	+	+	-	-
pUFR043	-	-	-	-	-
none	-	-	-	-	-

+: restoration of albicidin production, -: no restoration of albicidin production. All experiments were performed at least in duplicate with 15-20 exconjugants obtained from two independent triparental conjugations (with the exception of XaAM36 × pColH for which only two exconjugants were obtained by triparental conjugation).

2.9. Expression, detection and purification of histidine-tagged HtpG derivatives

An histidine affinity tag coding sequence, generated from the annealing of oligonucleotides HistagalbhtpgF and HistagalbhtpgR (Table 1), was inserted as an in frame *EcoRI* linker upstream from *htpG* in pAlbH, generating pHisAlbH. This construct was used for complementation studies and immunodetection of HtpG. His-tagged HtpG purification was performed with Ni-NTA affinity beads (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations (QIAexpressionist™) except that cells were lysed by serial passage through a French press at 14,000 psi. Western blot immunodetection of His-tagged HtpG was performed with penta-His antibody (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations (QIAexpress™ Handbook).

2.10. Subcellular fractionation

The cells from 250 ml of four day-old cultures of *X. albilineans* were pelleted by centrifugation (30 min at 10,000g). The pellet was resuspended in one tenth volume of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole). Each whole cell suspension was then processed three times in a French press at 14,000 psi. The resulting lysate was centrifuged for 30 min at 12,000g to pellet the remaining intact cells. The resulting clarified lysate was ultracentrifuged for two hours at 200,000g to pellet the cell membranes. The supernatant, containing the cytosolic fraction was used to purify His-tagged HtpG. The cell membrane pellet was briefly washed once with lysis buffer, resuspended in 200 µl PBS and was further processed for His-tagged HtpG and albicidin detection.

3. Results and discussion

3.1. Cloning and sequencing of the XALB3 region

Plasmid pALB639A (Table 1) harbours a 10 kb fragment from pALB639 that hybridized with plasmid

pAM12.1 carrying the Tn5 insertion site and flanking region of mutant XaAM12. This plasmid restored albicidin production in Tox⁻ mutants XaAM12, XaAM13 and XaAM36 and not in XALB1 and XALB2 Tox⁻ mutants, demonstrating that a third region involved in albicidin production, XALB3, was subcloned. Plasmid pALB639A was used to probe *EcoRI* restriction digests of pALB639 and genomic DNA from Xa23R1 and Tox⁻ mutants, and resulting banding patterns confirmed that XALB3 region differed from XALB1 and XALB2 (Fig. 1). The DNA sequence of the XALB3 region corresponding to the 9673 bp *EcoRI*-*Sau3AI* insert of pALB639A was determined (GenBank accession N° AM039979). The Tn5 insertion sites of XaAM12 and XaAM36 were located at positions 6500 and 7232, respectively (Fig. 1). An *EcoRI* restriction site was located 1 kb downstream from the cloning *Sau3AI* restriction site of pALB639 on the basis of the restriction analysis of pAM36.2 and Southern blot analysis of Xa23R1 (Fig. 1).

3.2. Genetic organisation of XALB3

Open reading frame analyses of the 9673 bp *EcoRI*-*Sau3AI* fragment revealed that only one ORF was disrupted in mutants XaAM12 and XaAM36. This ORF, designated *albXXII*, was located between nucleotides 6105 (ATG) and 8009 (TAA). The ATG is preceded at position -9 by the putative ribosome binding site sequence GGAG. A putative rho-independent terminator was identified at position 8082, 73 bases downstream from the ORF. The transcription initiation site was mapped by RACE, 53 bases upstream from the ATG, at position 6052. No close matches to *E. coli* σ^{70} promoter -10 (TATAAT) and -35 (TTGACA) consensus sequence were found upstream from the transcription initiation site. Alignment of the potential products of the flanking ORFs revealed a total of six putative ORFs (Fig. 1). With the exception of the first two ORFs (*Hyp4* and *Hyp3*), whose predicted products are, respectively, similar to *Caulobacter crescentus* conserved hypothetical proteins (GenBank Accession No. AAK22542 and AAK22541), the genetic organisation of the XALB3

region is closely related to the corresponding region in *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 (Genbank Accession No. NC003919) and *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (Genbank Accession No. NC003902) with a degree of identity/similarity of potential protein products of at least 69% and 76%, respectively.

3.3. Homology analysis

The product of the *albXXII* ORF is a protein of 634 aa with a predicted size of 71.5 kDa. This protein is very similar to heat shock proteins G [85% identity with *X. campestris* pv. *campestris* HtpG (Genbank Accession No. AAM41671) or with *X. axonopodis* pv. *citri* HtpG (Genbank Accession No. AAM37379) and 60% identity with the *E. coli* HtpG (Genbank Accession No. AAA23460)]. Accordingly, *albXXII* was renamed *htpG*. Bacterial HtpGs are homologues of the yeast Hsp82 and of the human Hsp90 α molecular chaperones (Genbank Accession No. P02829 and P07900 which show 41% and 37% similarity, respectively, with *E. coli* HtpG). All these proteins share a common structural plan ([16] and Fig. 2). The *htpG* gene can be deleted in *E. coli* with

no effect on the viability of the strain, but with a decreased growth rate at high temperatures [17]. Similarly, besides abolishing albicidin production, interruption of *htpG* did not affect the viability of *X. albilineans* at temperatures 28 and 30 °C (data not shown). Although its *in vivo* role remains unknown, the *E. coli* HtpG would facilitate *de novo* protein folding in stressed *E. coli* cells, presumably by interacting with the DnaK-DnaJ-GrpE molecular chaperone system [18].

3.4. Complementation analysis of *XALB3* mutants

Transfer of pAlbH (containing *X. albilineans htpG* fused with the promoter of the *lacZ* operon) into XaAM12, XaAM13 and XaAM36 restored albicidin production, thus confirming that this ORF was involved in albicidin biosynthesis (Table 2). Transfer of pEV639 (containing *htpG*, together with both the native promoter within the 542 bp upstream from the transcription initiation site and the putative rho-independent terminator, in opposite direction to the promoter of the *lacZ* operon) into XaAM12, XaAM13 and XaAM36 also restored albicidin production (Fig. 1 and Table 2).

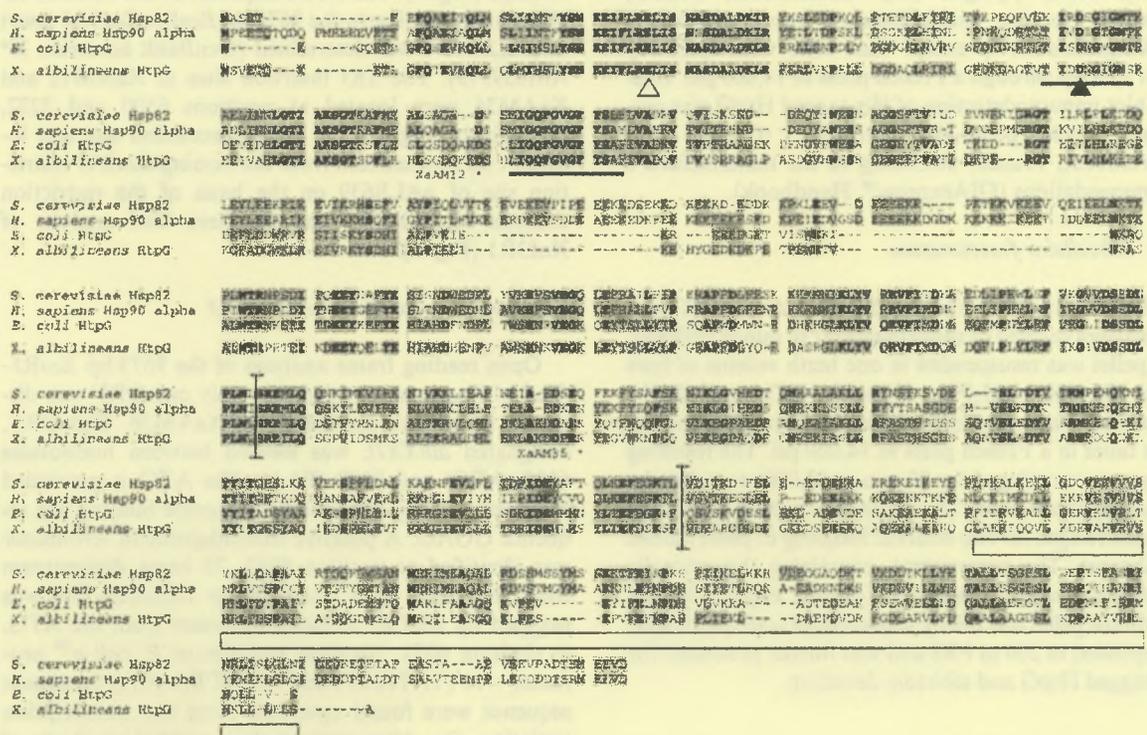


Fig. 2. Amino acid alignment of yeast Hsp82, human Hsp90 α , and *E. coli* and *X. albilineans* HtpGs using the clustal method. The black lines below the sequences represent the ATP binding domain as described by Prodromou and Pearl [16]. Arrowheads represent the location of conserved Glu 33 (open arrowhead) and Asp 79 (black arrowhead) residues in the Hsp82 nucleotide binding site. Location of the insertion of transposon Tn5 in mutants XaAM12 and XaAM36 is indicated by a star below the sequence. Vertical bars represent the borderlines between the N-terminal ATP binding region, the intermediate region and the carboxyterminal dimerisation domain as described by Nemoto et al. [23]. Horizontal box below the sequence alignment corresponds to the carboxy-terminal dimerisation region. Residues in bold are identical in all four organisms. Shaded residues are identical in at least two organisms.

Transposon mutagenesis classically generates polar mutations that affect all downstream cistrons of an operon. However, the complementation results with pEV639 indicated that the *X. albilineans* *htpG* ORF was not transcribed as a part of a larger operon (as could also be assessed from the genetic organisation of the XALB3 region), and confirmed that the promoter of this ORF is present in the 542 bp upstream from the transcription initiation site.

Additionally, the *E. coli* *htpG* gene, expressed from the promoter of the *lacZ* operon in pColH, also complemented the three XALB3 mutations, and fully restored albicidin production in XaAM12, XaAM13 and XaAM36. This heterologous complementation revealed the substantial functional interchangeability of the two prokaryotic *htpG* genes, a finding consistent with similar studies using eukaryotic Hsp90 [19].

3.5. *HtpG* inhibition assay

Because Hsp90 is antagonised by the antibiotic novobiocin [20], we hypothesised that this coumarinic antibiotic, that does not affect *X. albilineans* growth, may affect HtpG and therefore albicidin biosynthesis. To test the antagonistic activity of novobiocin on albicidin biosynthesis, *X. albilineans* Xa23R1 was grown for four days in liquid MW medium containing increasing amounts of novobiocin, from 30 µg/ml to 1.5 mg/l. Growth of Xa23R1, regularly monitored by absorbance at OD = 600, was not affected up to 150 µg/ml. In contrast, albicidin biosynthesis was reduced at the first tested concentration of novobiocin (30 µg/ml), and was no longer detectable at 45 µg/ml of novobiocin.

Overall, the high degree of identity between *X. albilineans* and *E. coli* HtpGs, the functional complementation of XaAM12, XaAM13 and XaAM36 *Tox*⁻ mutants with the *X. albilineans* and the *E. coli* *htpG* ORFs under the promoter of the *lacZ* operon, and the inhibition of albicidin biosynthesis by a Hsp90 antagonist, confirmed that *X. albilineans* HtpG is required for albicidin biosynthesis.

3.6. Subcellular localisation of *HtpG* and albicidin

In silico cellular localisation prediction with software PSORT was performed to predict the cellular localisation of the three PKS and NRPS enzymes involved in albicidin biosynthesis: AlbI (6879 aa, Genbank Accession No. CAE52339), AlbIV (941 aa, Genbank Accession No. CAE52342) and AlbIX (1959 aa, Genbank Accession No. CAE52334). AlbI and, to a lesser extent, AlbIV and AlbIX, were predicted to be membrane localised, a result consistent with the membrane localisation of polyketide synthase in *Myxococcus xanthus* [21]. We therefore hypothesised that albicidin was synthesised at the level of the cytoplasmic membrane

and we analysed the subcellular localisation of HtpG and albicidin.

In preliminary western blot experiments, a polyclonal antibody raised against human Hsp90 (Stressgen Biotechnologies) did not specifically react with *X. albilineans* HtpG (data not shown). A histidine tag coding sequence was therefore translationally fused to the amino terminal end of the protein, allowing both purification and specific detection. This construct (pHisAlbH) restored albicidin biosynthesis after transfer by triparental conjugation into *Tox*⁻ mutant XaAM12 (XALB3 region) but not after transfer into *Tox*⁻ mutant XaAM15 (XALB1 region), indicating that the His tag did not interfere with the *in vivo* function of HtpG in albicidin biosynthesis. A His tagged-HtpG specific 68kDa band was detected in whole cell protein extracts, regardless the cell type (*Tox*⁺ of XaAM12- pHisAlbH and *Tox*⁻ of XaAM15- pHisAlbH), demonstrating the utility of the His tag in HtpG detection (Fig. 3).

Protein extracts from *Tox*⁻ and *Tox*⁺ strains were fractionated into membrane and cytosolic fractions. His-tagged HtpG was found in the membrane fraction in albicidin producing cell type (XaAM12 mutant complemented by pHisAlbH) as well as in *Tox*⁻ mutant (XaAM15 mutant transformed but not complemented by pHisAlbH). Tagged HtpG was also detected in the cytosolic fraction, but only after a ≈15-fold concentration of the protein on Ni-NTA affinity beads. The presence of HtpG in the membrane is consistent with previous findings on localisation of the *Porphyromonas gingivalis* HtpG [22] (that shows 28% similarity with *X. albilineans* HtpG). Most interestingly, albicidin was also found in the membrane fraction (≈250 ng/ml), but not in the cytoplasmic fraction (even after concentration). Co-localisation of albicidin and *X. albilineans* HtpG in the membrane fraction and predicted membrane localisation of the albicidin structural genes AlbI,

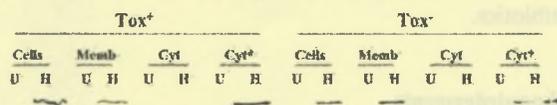


Fig. 3. Localisation of His tagged-HtpG in subcellular fractions of *X. albilineans* mutants. *Tox*⁺ and *Tox*⁻ *X. albilineans* strains (Albicidin defective mutant XaAM12 complemented with pHisAlbH (H) or transformed with pUFR043 (U) and mutant XaAM15 transformed with pHisAlbH (H) or pUFR043 (U), respectively) were fractionated as indicated in Materials and Methods section. The fractions (left to right) included whole cells (Cells), washed ultracentrifuge pelleted membrane fraction of cleared lysate (Memb), ultracentrifuge supernatant of cleared lysate (Cyt) and eluate of Ni-NTA His affinity chromatography column used for purification of His tagged HtpG from ultracentrifuge supernatant of cleared lysate (Cyt*). Nylon (Nitrocellulose) membranes were probed with mouse anti penta-His antibody. All lanes were loaded with the same amount of sample (20 µl). Arrowhead on the right of the figure corresponds to a molecular mass of ≈68 kDa.

AlbIV and AlbIX, although not a proof by itself, are in agreement with the involvement of *X. albilineans* HtpG in the NRPS/PKS biosynthesis machinery. Despite of its undoubted involvement in the biosynthesis of this hybrid non ribosomal peptide-polyketide antibiotic, the precise role of HtpG in albicidin biosynthesis remains unclear. In preliminary double hybrid experiments (Stratagene bacteriomatch II system) using *X. albilineans* HtpG as the bait, no client protein was identified for HtpG when a *X. albilineans* Sau3AI genomic library and a sub-library, made with the previously identified albicidin biosynthesis genes, were screened (data not shown).

4. Conclusion

This study represents a milestone in our effort to help clarify the role of albicidin in leaf scald disease progress since the availability of all three genomic regions known to be involved in albicidin production (XALB1, XALB2 and XALB3) offers the possibility to characterise all enzymes of the albicidin biosynthesis pathway, including structural, resistance, secretory and regulatory elements. In addition, cloning all of the biosynthetic genes involved in albicidin production may help to overcome limitations in albicidin studies due to low yields of toxin production by wild-type *X. albilineans* [3]. Proof that all genes involved in albicidin biosynthesis are now identified will require expression in a heterologous host. Since all mutants isolated in the earlier, extensive transposon mutagenesis study of *X. albilineans* [5], have now been complemented, it is possible, if not likely, that all of the albicidin biosynthetic genes have been cloned. If so, this effort offers the possibility to engineer high level co-expression of the genes to obtain higher albicidin production. It also provides the potential to manipulate the albicidin biosynthetic machinery in order to obtain structural variants of this potent novel class of antibiotics.

Acknowledgements

E. Vivien was supported by a fellowship from the Direction Scientifique du CIRAD. We thank Dr J.B. Morel for critical reading of the manuscript and Sandrine Duplan for her expertise and skillful assistance. We also thank Dr J.F. Dubremet for the French press facilities at Montpellier University - UMII.

References

- [1] Rott, P. and Davis, M.J. (2000) Leaf scald In: A Guide to Sugarcane Diseases (Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, A.S. and Sauntally, A.S., Eds.), p. 38. La librairie du Cirad, Montpellier.
- [2] Zhang, L. and Birch, R.G. (1997) The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 9984-9989.
- [3] Birch, R.G. (2001) *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Mol. Plant Pathol. 2, 1-11.
- [4] R.G. Birch, S.S. Patil, U.S. Patent 4,525,354, June 1985.
- [5] Rott, P.C., Costet, L., Davis, M.J., Frutos, R. and Gabriel, D.W. (1996) At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. J. Bacteriol. 178, 4590-4596.
- [6] Huang, G., Zhang, L. and Birch, R.G. (2001) A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. Microbiology 147, 631-642.
- [7] Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D.W. and Rott, P.C. (2004) Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. Mol. Plant-Microbe Int. 17, 414-427.
- [8] Cane, D.E. (1997) A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. Chem. Rev. 97, 2463-2706.
- [9] Huang, G., Zhang, L. and Birch, R.G. (2000) Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. Gene. 258, 193-199.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [11] Zhang, L., Xu, J. and Birch, R.G. (1998) Factors affecting biosynthesis by *Xanthomonas albilineans* of albicidin antibiotics and phytotoxins. J. Appl. Microbiol. 85, 1023-1028.
- [12] Gabriel, D.W. and De Feyter, R. (1992) RFLP analyses and gene tagging for bacterial identification and taxonomy In: Molecular Plant Pathology, A Practical Approach (Gurr, S.J., McPherson, M.J. and Bowles, D.J., Eds.), Vol. 1, pp. 51-66. IRL Press, Oxford.
- [13] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- [14] Brendel, V. and Trifonov, E.N. (1984) A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators. Nucleic Acids Res. 12, 4411-4427.
- [15] Nakai, K. and Kanehisa, M. (1991) Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. Proteins: Struct. Funct. Genet. 11, 95-110.
- [16] Prodromou, C. and Pearl, L.H. (2003) Structure and functional relationships of Hsp90. Curr. Cancer Drug Targets 5, 301-323.
- [17] Bardwell, J.C. and Craig, E.A. (1988) Ancient heat shock gene is dispensable. J. Bacteriol. 170, 2977-2983.
- [18] Thomas, J.G. and Bancyx, F. (2000) ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. Mol. Microbiol. 36, 1360-1370.
- [19] Louvion, J.F., Warth, R. and Picard, D. (1996) Two eukaryotic specific regions of Hsp82 are dispensable for its viability and signal transduction functions in yeast Hsp90. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10832-10837.
- [20] Schulte, T.W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T., Sugimoto, S., Nakano, H., Lee, Y.S., Simen, B.B., Argon, Y., Felts, S., Toft, D.O., Neckers, L.M. and Sharma, S.V. (1999) Interaction of radicalical with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. Mol. Endocrinol. 9, 1435-1448.

- [21] Simunovic, V., Gherardini, F.C. and Shimkets, L.J. (2003) Membrane localization of motility, signaling, and polyketide synthetase proteins in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 185, 5066-5075.
- [22] Lopatin, D.E., Combs, A., Sweier, D.G., Fenno, J.C. and Dhamija, S. (2000) Characterization of heat-inducible expression and cloning of HtpG (Hsp90 homologue) of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 68, 1980-1987.
- [23] Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H. and Takagii, T. (1997) Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). *J. Biol. Chem.* 272, 26179-26187.

CHAPITRE IV :

EXPRESSION D'ALBICIDINE EN SYSTEME HETEROLOGUE

Résumé

Le faible niveau de production d'albicidine chez *X. albilineans* a considérablement ralenti les études de son spectre d'action et de ses applications thérapeutiques. Il a aussi empêché la détermination de la structure chimique de cette toxine aux propriétés antibiotiques. Les gènes de biosynthèse de l'albicidine ont néanmoins été identifiés, clonés et séquencés. Les 68 kilobases d'ADN génomique de *X. albilineans* caractérisés contiennent, parmi les 22 ORFs identifiées, trois gènes codant pour des PKS et des NRPS. L'analyse *in silico* de ces gènes a révélé un certain nombre de caractéristiques uniques des mégasynthèses responsables de la synthèse de l'albicidine (voir chapitre II). Le présent chapitre traite du transfert des trois régions impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine (XALB1, XALB2 et XALB3) vers un hôte à croissance rapide, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* et de la synthèse par cet hôte transformé, d'une activité antibiotique aux propriétés similaires à celles de l'albicidine. En l'absence de données de structure de l'albicidine, la confirmation de la biosynthèse d'albicidine par l'hôte transformé a été obtenue par comparaison des spectres d'action des deux activités antibiotiques sur une série de souches d'*E. coli* transformées avec différents gènes de résistance à l'albicidine. Ces résultats permettent désormais d'envisager l'utilisation des gènes de biosynthèse de l'albicidine en ingénierie métabolique et de surproduire l'albicidine afin d'en déterminer la structure chimique, l'activité pharmacologique et le spectre d'action.

1 Introduction

Les propriétés pharmacologiques de nombreux polycétides et peptides non ribosomiaux (antibiotiques, antimétabolites, immunosuppresseurs) et leur très grande variabilité structurale suscitent un intérêt croissant. A ce jour, plus d'une centaine d'articles de synthèse ont été publiés sur ces métabolites secondaires et leurs voies de biosynthèse, alors que les premiers articles décrivant les PKS et les NRPS datent à peine de la fin des années 1980, voire du début des années 1990.

1.1 Expression hétérologue des PKS et des NRPS

L'explosion du nombre de systèmes PKS et/ou NRPS clonés promeut la mise au point de systèmes d'expression hétérologue robustes et efficaces. En effet, la vaste majorité des polycétides et peptides non ribosomiaux sont produits par des organismes très différents des quelques organismes modèles habituels des laboratoires de microbiologie. Un des obstacles majeurs dans l'étude de leurs voies de biosynthèse consiste par conséquent en la non-maîtrise de la culture de leur hôte naturel. D'autre part, des stratégies de criblage de banques d'ADN du sol (contenant des séquences de micro-organismes non cultivables) ont permis d'identifier de nouveaux systèmes PKS dont l'hôte naturel demeure non identifié (Courtois *et al.*, 2003, Ginolhac *et al.*, 2004). L'utilisation de ces approches métagénomiques permet d'accéder à des génomes encore inexplorés, mais implique impérativement le transfert des voies de biosynthèse depuis leur hôte naturel vers un hôte hétérologue, dont la génétique est accessible. L'expression hétérologue des PKS et des NRPS est par conséquent une étape fondamentale dans l'étude de ces métabolites (que leur origine soit connue ou non). Cet état de fait est encore plus crucial dès lors qu'il s'agit d'exploiter commercialement les propriétés pharmacologiques d'un métabolite qu'il faudra alors produire à grande échelle en fermenteur. La 6dEBS a été le premier système PKS à avoir été transféré avec succès de *Streptomyces erythraea*, son hôte naturel, vers *S. coelicolor* (Kao *et al.*, 1994). Depuis ces travaux pionniers, le système de biosynthèse de cet aglycone de l'érythromycine a également été transféré chez *E. coli* (Pfeifer & Khosla, 2001). Dans cet intervalle, de nombreux systèmes PKS ont été exprimés en systèmes hétérologues, en particulier chez *Streptomyces coelicolor*, *S. erythraea*, *S. lividans* et *S. parvulus*. Parmi les

polycétides transférés chez ces hôtes (intégralement mais aussi partiellement et ou combinés les uns aux autres), citons les dérivés de frénolicine, d'érythromycine, d'oxytétracycline, de R1128, d'oléandomycine, de mégalomycine, de tétracenomycine, d'épothilone, ou encore de 6-méthylsalicylate (revu par Pfeifer & Khosla, 2001). Par contre, seuls deux systèmes NRPS et deux systèmes hybrides ont été transférés chez des hôtes hétérologues (Tableau 3)

Tableau 3 : Premiers systèmes PKS et NRPS transférés en systèmes hétérologues.

Molécule	Système de biosynthèse	Hôte naturel	Hôte hétérologue	Fonction	Référence
Bacitracin	NRPS	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	antibiotique	Eppelmann, 2001
Safracin	"	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	antiprolifératif antitumoral	Velasco, 2005
6-dEB (aglycone)	PKS	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	précurseur de l'érythromycine	Kao et al., 1994
"	"	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	<i>E. coli</i>	"	Pfeifer & Khosla, 2001
Combinaisons bimoldulaires de PKS	"	<i>Streptomyces</i> 8 PKS différentes	<i>E. coli</i>	A déterminer pour les 154 di-cétides	Menzella et al., 2005
Yersiniabactin	hybride PKS/NRPS	<i>Yersinia pestis</i>	<i>E. coli</i>	sidérophore	Pfeifer et al., 2003
Albicidine	"	<i>Xanthomonas albilineans</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	antibiotique	Vivien et al., soumis à AEM

Le dénominateur commun entre ces différents systèmes hétérologues est qu'il a fallu vaincre un certain nombre de défis liés aux particularités de systèmes aussi singuliers que les PKS ou les NRPS. Un certain nombre de facteurs sont donc à prendre en compte dès lors qu'il s'agit d'exprimer des PKS ou des NRPS fonctionnelles en système hétérologue :

1.1.1 Modifications post traductionnelles

Les sites actifs des domaines ACP et PCP des PKS et des NRPS comportent un groupement thiol provenant du groupement prosthétique phosphopantéthéinyl du Coenzyme A (cf. Chapitre II section 1.1.1.2). En l'absence de ces groupements, qui

sont ajoutés aux domaines ACP et PCP par modification post traductionnelles par des enzymes appartenant à la famille des phosphopantéthéinyl transférase (Lambalot *et al.*, 1996), les mégasynthèses sont inactives. Le degré de spécificité d'une phosphopantéthéinyl transférase pour le domaine CP correspondant est variable. Certaines enzymes sont capables de modifier un large spectre de domaines ACP ou PCP (Ppant transférase impliquée dans la biosynthèse de surfactine par *B. subtilis* ; Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998), alors que d'autres sont très spécifiques (FAS Pptase d'*E.coli* ; Lambalot *et al.*, 1996). Le choix d'une Pptase donnée peut par conséquent s'avérer crucial lorsqu'il s'agit d'exprimer des PKS et des NRPS actives dans un système hétérologue. Les facteurs à prendre en compte sont doubles : spécificité de la Pptase vis à vis de son substrat et la synchronisation de cette enzyme de modification avec le reste de la machinerie biosynthétique.

1.1.2 Disponibilité du substrat

Une fois synthétisées et modifiées, PKS et NRPS vont pouvoir synthétiser leurs produits respectifs à partir d'Acyls-CoA et d'acides aminés, respectivement. Néanmoins, ces substrats doivent être présents et disponibles en quantité suffisante et synchrone pour ne pas être un facteur limitant dans la biosynthèse du métabolite secondaire. Certains substrats des mégasynthèses sont chiraux et le domaine incorporant ces substrats présente alors une stéréosélectivité accrue, ce qui implique que l'hôte hétérologue doit pouvoir fournir, non seulement le substrat approprié mais dans la conformation appropriée. Ici encore, le choix d'un hôte pour l'expression hétérologue doit prendre en compte ces données. Heureusement pour le microbiologiste, les substrats des NRPS et des PKS sont des molécules généralement présentes chez la plupart des bactéries (acide aminés naturels et acétyl-CoA). Si un module spécifie un substrat rare, les gènes gouvernant la biosynthèse de ce substrat sont généralement présents au sein même du groupement des gènes de PKS et NRPS (August *et al.*, 1998).

1.1.3 Modifications post mégasynthase

Une fois le polycétide ou le peptide non ribosomal synthétisé, ce dernier peut avoir à subir des modifications afin d'acquérir ses propriétés biologiques (par exemple, glycosylation du DEB pour obtenir de l'érythromycine , Rawlings, 2001a ; cf. Chapitre II section 1.2.1.6). Il est alors également nécessaire de transférer vers l'hôte

hétérologue les enzymes responsables de ces modifications. Ces enzymes sont généralement monofonctionnelles et leur transfert ne pose pas de souci majeurs. Néanmoins, comme dans le cas de certains PK, l'enzyme de modification greffe un substrat rare produit par une voie de biosynthèse propre, qui devra alors également être transférée (c'est le cas de la glycosyltransférase de la daunorubicine synthétase qui catalyse le transfert d'un TDP glucose; Otten *et al.*, 1997).

1.1.4 Résistance

La production d'un métabolite actif (PK ou NRP) en système hétérologue doit prendre en considération l'éventualité de la toxicité de ce métabolite pour la cellule productrice. Ce problème est généralement réglé en transférant avec les gènes de biosynthèse le ou les gènes de résistance au métabolite produit. Ces gènes sont en règle générale présents au sein même du groupement de gènes de biosynthèse et sont par conséquent transférés avec ces derniers. Ce transfert simultané permet en outre d'assurer une régulation coordonnée entre production du métabolite et production du produit du gène de résistance.

En revanche, la sensibilité du producteur hétérologue au métabolite qu'il produit peut devenir un point capital lorsqu'il s'agit de produire un ou plusieurs analogues non naturels de PK ou de NRP par ingénierie métabolique (voir point 1.2 ci dessous). En effet, les manipulations des voies de biosynthèse de ces métabolites secondaires permettent la production d'analogues "artificiels" de produits naturels dont l'activité est inconnue et pour lequel, par définition, il n'existe pas *a priori* de gène de résistance (Pfeifer & Khosla, 2001).

1.1.5 Export

Peu de données sont disponibles concernant l'export des produits des PKS et des NRPS; néanmoins, s'agissant généralement de composés actifs potentiellement cytotoxiques pour la cellule les produisant, ces produits doivent être exportés. Des gènes codant pour des pompes ont été décrits dans les groupements regroupant les gènes codant pour les PKS et les NRPS (Royer *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2000 Fernandez-Moreno *et al.*, 1991, Mao *et al.*, 1999). Ces pompes sont généralement considérées comme étant les produits des gènes de résistance qui font partie des groupements de gènes PKS NRPS. Des alignements de séquence de ces systèmes d'efflux permettent de lier ces derniers à la superfamille des facilitateurs (MFS pour

Major Facilitators Superfamily; Bostock, 2000). Ils regroupent notamment les gènes de résistance à la méthylénomycine A (Mmr), à l'actinrhodine (ActII-2), à la tétracénomycine (Tcma) et à l'albicidine (AlbXIV).

1.2 Ingénierie métabolique des PKS et NRPS

L'ingénierie métabolique est une approche émergente de la compréhension puis de l'utilisation de voies métaboliques particulières. Comme son nom l'indique, l'ingénierie métabolique est la manipulation et l'altération de voies métaboliques, afin de comprendre et d'utiliser ces voies à des fins de synthèse de composés chimiques, mais également de transduction d'énergie ou d'arrangement supra moléculaires. Classiquement, l'ingénierie métabolique implique le réarrangement d'enzymes, de protéines de transport et de fonctions de régulations d'une cellule, généralement au moyen des techniques d'ingénierie de l'ADN, mais également grâce à d'autres techniques comme celle du feeding (Moore & Hopke, 2001).

Au vu du potentiel pharmacologique des polycétides et des NRP, et de la structure de leurs enzymes de biosynthèse, PKS et NRPS constituent d'excellents candidats pour l'obtention de nouvelles molécules par ingénierie métabolique. Quatre stratégies complémentaires peuvent être mise en oeuvre afin d'altérer la biosynthèse des PKS et des NRPS et d'en obtenir des variants structuraux: i) la modification d'un ou plusieurs domaines, ii) la modification des liaisons entre modules, iii) la combinaison de modules natifs et de modules modifiés, iv) le feeding avec des composés artificiels (mutasynthèse) ; enfin il est également possible de v) jouer sur la voie de biosynthèse conduisant à la production du substrat des enzymes de modification post PKS/NRPS. Notons enfin que ces stratégies (exception faite du point v) ne peuvent pas s'appliquer aux PKS de type 2 (itératives), la modification d'un domaine ayant alors des conséquences imprévisibles et incontrôlables pour le reste de la voie de biosynthèse (Staunton, 2001).

1.2.1 *Mutagenèse de domaines*

C'est la technique la plus simple et la plus usitée. Elle consiste à altérer un domaine, par inactivation, par délétion ou par substitution avec un autre domaine. De nombreuses modifications de PKS ont été décrites dans la littérature : échanges de module d'initiation (Marsden *et al.*, 1998), modification des niveaux de réduction d'un PK par inactivation d'un domaine KR ou inversement, insertion de domaines

supplémentaires (McDaniel *et al.*, 1997), modification de la réticulation des PK par substitution de domaines AT de spécificité différente (Stassi *et al.*, 1998), raccourcissement du PK par re-localisation du domaine TE (Cortes *et al.*, 1995), etc. De même, l'échange de domaines A-PCP de spécificités différentes ou la modification de la spécificité d'un domaine A par mutation ponctuelle permettent de modifier la structure et la composition d'un NRP (Eppelmann, 2002; Stachelhaus 1995).

Toutes ces modifications peuvent être combinées les unes aux autres afin d'obtenir des métabolites présentant des altérations multiples par rapport au produit naturel d'origine (McDaniel *et al.*, 1999). Certaines limites à ces manipulations existent néanmoins : les modifications décrites ci-dessus sont loin d'être triviales et limitent par conséquent l'étendue des possibles. D'autre part, le rendement de la biosynthèse constitue une autre limitation : l'augmentation du nombre de modification d'une mégasynthase s'accompagne généralement d'une réduction significative de la quantité d'analogue produite (McDaniel *et al.*, 1999).

1.2.2 Altération des liaisons inter-modules

Une stratégie alternative consiste à substituer un module entier à un autre, ce qui est faisable à condition de respecter les domaines de liaison inter-module décrits au point 1.3 du chapitre II (Gokhale *et al.*, 1999). L'absence ou la non correspondance entre les domaines de liaison carboxyterminal d'un polypeptide et aminoterminal du polypeptide en aval conduit à la production de mégasynthèses qui sont incapable de synthétiser le métabolite attendu.

1.2.3 Biosynthèse mutationnelle : Mutasynthèse

Cette technologie couple la mutagenèse d'une PKS et la synthèse chimique organique. Le premier domaine KS d'une PKS est inactivé par mutagenèse, la mégasynthase est alors incapable d'initier la biosynthèse d'un polycétide. L'assemblage du polycétide est alors artificiellement initié en fournissant à la cellule des dicétides ou tricétides d'origine synthétique. La biosynthèse est initiée si la PKS reconnaît le composé synthétique et il en résulte alors un composé altéré. Cette approche a notamment permis de synthétiser des analogues de l'avermectine (Dutton *et al.*, 1994) et de l'érythromycine (Jacobsen *et al.*, 1998)

1.2.4 Combinaison d'altérations

Cette stratégie permet de synthétiser des collections d'analogues structuraux. Par une approche multiplasmide, il est possible de combiner plusieurs modules provenant de différentes voies de biosynthèse de produits différents, comportant ou non une altération. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour générer une collection de PK synthétisés par des modules appartenant à la picromycine, à l'oléandomycine et à la 6 déoxyerytronolide B synthétase, présentant ou non une altération (Tang *et al.*, 2000b).

1.2.5 Altération des modifications post PKS

Une fois que le métabolite en cours de synthèse a atteint le domaine TE et qu'il est libéré, celui-ci peut subir des modifications substantielles qui vont altérer ses propriétés biologiques (cf. paragraphe 1.2.1.6). La manipulation de ces enzymes de modification est une autre alternative prometteuse pour la production de variants structuraux de PK et NRP. A titre d'exemple, on peut citer la création d'un nouveau déoxysucre par combinaison de gènes provenant de deux voies de biosynthèse différentes (picromycine/méthymycine et calichéamycine) (Zhao *et al.*, 2003).

Plus de 200 nouvelles molécules obtenues en utilisant une ou plusieurs des stratégies ci-dessus ont été décrites, prouvant la faisabilité de cette technologie et ouvrant de nouvelles perspectives. La boîte à outils de l'ingénierie métabolique des PKS et des NRPS s'étoffe continuellement et de nouvelles stratégies devraient voir le jour prochainement.

2 Résultats

Les trois régions impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine précédemment identifiées ont été sous clonées et transférées sous la forme de deux plasmides vers un hôte à croissance rapide, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Ce transfert a conduit à la synthèse par cet hôte transformé, d'une activité antibiotique aux propriétés similaires à celles de l'albicidine. Ces résultats qui valident le modèle théorique de biosynthèse de l'albicidine présenté au chapitre II, font l'objet d'un manuscrit qui a été soumis à la revue Applied and Environmental Microbiology le 1^{er} septembre 2005. Ce manuscrit est présenté ci-dessous.

Heterologous expression of the complete PKS/NRPS albicidin biosynthetic gene cluster

Eric Vivien¹, Delphine Pitorre¹, Stéphane Cociancich¹, Isabelle Pieretti¹, Dean W. Gabriel²,
Philippe C. Rott¹ and Monique Royer^{1*}

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement,
UMR 385 BGPI, Campus international de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5,
France

²Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, Florida 32611

* Corresponding author; Fax: (33) 4 99 62 48 08; E-mail: monique.royer@cirad.fr.

Running title : Albicidin heterologous expression

ABSTRACT

Albicidin is a highly potent antibiotic and phytotoxin produced by *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald disease of sugarcane. Low yields of albicidin production in slow growing *X. albilineans* have slowed studies of its chemical structure and potential therapeutic applications. *In silico* analysis of the albicidin biosynthetic gene cluster revealed three large polyketide synthases (PKSs) and unusual nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) specifying non-proteinogenic substrates. We report here the transfer of the complete 49 kb albicidin biosynthetic gene cluster along with two additional 3 kb regions also essential for albicidin biosynthesis into a fast growing host, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and the subsequent heterologous production of albicidin. This is the first report of heterologous

Rapport-gratuit.com



Manuscrit soumis à Applied and Environmental Microbiology le 1^{er} septembre 05

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRE

1 expression of an entire pathway encoding a hybrid polyketide/nonribosomal peptide
2 antibiotic.

3 INTRODUCTION

4 Nonribosomal peptides and polyketides are natural products that represent large families of
5 bioactive secondary metabolites produced by bacteria and fungi. These compounds have
6 generated great interest because they show pharmaceutically relevant properties such as
7 antibiotic, anticancer or immunosuppressive activities associated with high structural diversity
8 (32). Although extremely diverse, these secondary metabolites share the same basic
9 biosynthetic scheme. Additionally, engineering the biosynthetic pathways of these
10 nonribosomal peptides and polyketides is very promising for production of small therapeutic
11 agents. Design of novel "un-natural products" by metabolic engineering (33) is possible since
12 nonribosomal peptides and polyketides derive from complex and modular enzymatic systems
13 that can be manipulated (9, 13, 32, 33).

14 Production of polyketide and nonribosomal peptides is often hampered by low levels of
15 biosynthesis and slow growth capacity of the original host. These drawbacks can be
16 circumvented by transferring the biosynthetic machinery to a production host more amenable
17 to industrial fermentation. Obviously, the larger the number of genes involved, the greater the
18 complexity and challenge of such a transfer. First, cloning and expression of the large gene
19 clusters encoding polyketide synthases (PKSs) and nonribosomal peptide synthetases
20 (NRPSs) remains challenging due to gene and protein stability, protein degradation and
21 unpredictable folding of the biosynthetic enzymes (18, 26). Secondly, generation of active
22 NRPS and PKS complexes in a heterologous host requires coordinated expression of the pool
23 of transferred genes, a problem worsened by the fact that PKSs and NRPSs require post-
24 translational pantetheinylation (18). Finally, PKSs and NRPSs require a pool of intracellular
25 substrates such as acyl CoA or proteinogenic and non proteinogenic amino-acids to synthesize

1 their natural product. Therefore, this pool of substrates needs to be available in the
2 heterologous host.

3 Albicidin is the major component of a toxin complex produced by *Xanthomonas albilineans*
4 (3). This species is a slow growing bacterium and the causal agent of leaf scald, a vascular
5 disease of sugarcane (21). Albicidin is involved in pathogenicity of *X. albilineans* and inhibits
6 replication of chloroplastic DNA (6, 7). Transgenic sugarcane plants expressing the albicidin
7 detoxifying enzyme AlbD are resistant to leaf scald disease (35). Albicidin also inhibits
8 replication of DNA from prokaryotes at nanomolar concentrations (5) and probably serves to
9 reduce competition from other bacteria in the same ecological niche (3). The capacity of
10 albicidin to inhibit DNA replication of a wide range of bacteria (Gram + and Gram -) is of
11 interest for the development of a putatively potent clinical antibiotic (4, 5).

12 Previous analyses by NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and mass spectrometry failed to
13 elucidate the structure of albicidin, but however allowed estimation of its molecular weight
14 (842 Da) and number of carbon atoms (38 carbons) (4, 5). Transposon mutagenesis studies
15 led to the identification, cloning and sequencing of three genomic regions (XALB1, XALB2
16 and XALB3) involved in albicidin biosynthesis (20, 22, 31). XALB1 contains the majority of
17 albicidin biosynthetic genes in a cluster of 20 ORFs (*albI*-*albXX*). *albI*, *albIV* and *albIX*
18 encode three large PKSs and NRPSs, and *in silico* analysis of these biosynthetic enzymes
19 resulted in a proposed partial structure of the albicidin backbone (22). The other ORFs encode
20 putative resistance, modifying and regulatory genes (22). XALB2 and XALB3 each contain a
21 single biosynthetic gene, *albXXI* and *albXXII* whose products are respectively a
22 phosphopantetheinyl transferase and HtpG (22, 31). Albicidin is synthesized by a unique
23 hybrid polyketide-nonribosomal peptide synthetase complex that generates a structure that
24 does not resemble any other described to date. Moreover, albicidin NRPS modules are
25 thought to incorporate unusual non-proteinogenic substrates (22), making these NRPS

1 modules potentially valuable tools for metabolic engineering. A heterologous system for
2 albicidin production is therefore highly desirable i) to gain experience in changing the levels
3 of expression of the enzyme modules; ii) to determine the effects of swapping the enzyme
4 modules with similar modules from other systems and iii) to obtain large quantities of
5 albicidin in order to make thorough NMR and mass spectrometry analyses. Deciphering the
6 structure of albicidin should allow the generation of a new family of antibiotics by generation
7 of structural analogues. Furthermore, unusual albicidin NRPS substrates could be used for
8 implementing substrate libraries for metabolic engineering of un-natural products.
9 We report here the construction of a two plasmids expression system harboring the complete
10 albicidin biosynthetic gene set, its transfer into a fast growing heterologous host,
11 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and the subsequent heterologous production of an
12 antibiotic activity similar to that of albicidin.

13 MATERIALS AND METHODS

14 Bacterial strains and plasmids and culture conditions.

15 Sources of bacterial strains and relevant characteristics are presented in Table 1. *X.*
16 *albilineans* and *Escherichia coli* culture conditions and bacterial conjugation have been
17 described elsewhere (20, 23).

18 Nucleic acid manipulations, oligonucleotide synthesis and DNA sequencing.

19 Standard molecular techniques were used to manipulate DNA (23). Oligonucleotide synthesis
20 and DNA sequencing were from Genome Express (Grenoble or Montreuil, France) who also
21 performed sequencing.

22 Construction of a luciferase assay system for screening of xanthomonads

23 The 206 bp *albI* promoter sequence was PCR amplified from pALB571 using primers
24 5'acgcggatcccagcaggggtgtcatacag3' and 5'acgcggatccggccagcgtggtgctactac3', and was
25 subcloned into the *Bgl*III site of pSP-luc+ Vector MCS (Promega). The resulting promoter –

1 luciferase reporter cassette was then subcloned as an *EcoRI* – *KpnI* fragment into the broad
2 host range (IncW) shuttle vector pUFR053, in opposite orientation to the *lacZ* promoter. This
3 construct was transferred into several xanthomonads, and exconjugants were assayed for
4 luciferase activity using Promega's luciferase assay system TM according to the
5 manufacturer's recommendations. Luciferase activity was monitored using a TD-20/20
6 Turner luminometer (Turner BioSystems).

7 **Construction of a two plasmids system for albicidin heterologous expression**

8 The pALB571 plasmid is from a Xa23R1 genomic library constructed into the broad host
9 range (IncW) shuttle vector pUFR043 (20). The pALB571 insert corresponds to nucleotides
10 19,001 to 55,839 (*albl* to *alblX*) from *X. albilineans* gene cluster XALB1 (22) (Accession N°
11 AJ586576). The pLAFRK7 construct harboring albicidin genes *albX* to *albXXII* was
12 generated by subcloning together into the broad host range (IncP) shuttle vector pLAFR3
13 three fragments isolated from three additional Xa23R1 genomic library clones (pALB389,
14 pALB540 and pALB639). These three fragments correspond to: i) nucleotides 5,896 to
15 19,216 (*albX* to *albXX*) from XALB1 region (22) (Accession N° AJ586576); ii) nucleotides 1
16 to 2,986 (*albXXI*) from XALB2 region (22) (Accession N° AJ586577), and iii) nucleotides
17 5,510 to 8,119 (*albXXII*) from XALB3 region (31) (Accession N° AM039379), respectively.
18 The combination of the two constructs, pALB571 and pLAFRK7, was used for transfer of the
19 complete albicidin biosynthetic machinery.

20 **Isolation of albicidin**

21 Albicidin was isolated from Xa23R1 cultures as described by Birch & Patil (5) except that
22 Sephadex LH20 was replaced by Toyopearl[®] HW40S (Tosoh Biosep). The fractions active
23 against *E. coli* obtained after HW40S chromatography were pooled, evaporated and used in
24 the reported experiments. Albicidin was quantified with a bioassay, using the following
25 formula (34): free albicidin (ng/ml) = $4.576 e^{(0.315 \times \text{Inhibition zone diameter in mm})}$.

1 Cloning of *albXIV* and *albXIX*

2 Fragments of 1,510 bp and 622 bp, corresponding to the *albXIV* and *albXIX* ORFs,
3 respectively, were PCR amplified from cosmid pALB540 with two pairs of primers (*alb14F*
4 5'ccggaattccatgcaaaaaccaaggaagc3' - *alb14R* 5'cgcgatcctacggcgatgattgtgg3' and *alb19F*
5 5'ccggaattccatgcccggccaagacc3' - *alb19R* 5'cgcgatcctcaatcggacagctcg3'). The two fragments
6 were subcloned into vector pBCKS(+) yielding pBCAlbXIV and pBCAlbXIX respectively.

7 Albicidin bioassays

8 Isolated albidin was detected and quantified as described previously (34) except that the
9 mixtures of *E. coli* DH5 α strains plus molten Noble agar were supplemented with IPTG (100
10 μ M) and an appropriate antibiotic (25 μ g/ml chloramphenicol for strains harboring pBCKS(+)
11 derivatives or 50 μ g/ml ampicilin for strains harboring pGEX or pUC19 derivatives). The
12 antibiotic activity of isolated albidin is expressed by the area of the growth inhibition zone
13 in mm². Bioassays with recombinant *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* were performed as
14 previously described for *X. albilineans* (20) except that i) tetracycline (12 μ g/ml), gentamycin
15 (3 μ g/ml) and MOPS (20 mM, pH 7 Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were added in the
16 culture medium, and ii) *E. coli* tester strains harbored pLAFR3 and pUFR043 plasmids to
17 confer resistance to these additional antibiotics. The production of antibiotic by Xves-alb was
18 quantified by calculating the width of the *E. coli* growth inhibition ring: $(D-d)/2$ where D =
19 diameter of the *E. coli* growth inhibition ring and d = diameter of the *Xanthomonas* culture.
20 For comparison of albidin resistant *E. coli* tester strains (figure 3), bioassays were
21 performed without gentamycin because of an incompatibility of the use of this antibiotic with
22 AlbD activity.

23

24

25

1 RESULTS

2 Construction of a luciferase assay system for the screening of heterologous hosts

3 The previously characterized 206 bp promoter region from *albl* (12), was operably fused with
4 the luciferase reporter gene cassette in order to screen its activity in *E. coli* and eight different
5 xanthomonads, including *X. albilineans* (Fig. 1). Luciferase activity varied according to
6 bacterial species. No activity was detected in *E. coli*, suggesting that this promoter is not
7 functionally recognized in this host. The *albl* promoter also appeared less efficiently
8 recognized in all xanthomonads tested other than *X. albilineans*. *X. axonopodis* pv.
9 *vesicatoria* and *X. arboricola* pv. *pruni* showed acceptable levels of *albl* promoter activity,
10 which at best was ca. 50% reduced from levels observed in *X. albilineans*. These two fast
11 growing xanthomonads were therefore selected as potential heterologous hosts for albicidin
12 production.

13 Construction of a two plasmids albicidin expression system

14 A two plasmids expression system was constructed to attempt to transfer the entire functional
15 albicidin biosynthetic gene pathway. The previously described plasmid pALB571 (20, 22)
16 was used to transfer *albl* to *albIX*. The remaining XALB1 ORFs (*albX* to *albXX*) were
17 subcloned into a single plasmid, designated pLAFRK7, along with XALB2 (encoding
18 *albXXI*) and XALB3 (encoding *albXXII*). Plasmids pALB571 and pLAFRK7 derive from two
19 different vectors belonging to different incompatibility groups.

20 Albicidin activity production in heterologous hosts

21 Four combinations of plasmids, including empty vector (pUFR043 and pLAFR3) controls
22 (*i.e.* pUFR043/pLAFR3, pUFR043/pLAFRK7, pALB571/pLAFR3 and pALB571/pLAFRK7)
23 were transferred to the two fast growing hosts, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* strain Xcv 91-
24 11BR1 and *X. arboricola* pv. *pruni* strain XpruR1 by triparental mating. Successful transfer
25 of all plasmids was only achieved with Xcv 91-11BR1. Assays for albicidin production were

1 performed with exconjugants of this strain carrying the four plasmid combinations. Two *E.*
2 *coli* strains, DH5 α and DH5 α Alb^r, were used as tester strains. DH5 α is sensitive to albicidin,
3 whereas DH5 α Alb^r is a spontaneous albicidin resistant derivative that was isolated in a
4 growth inhibition zone produced by *X. albilineans* strain Xa23R1 in an albicidin bioassay
5 (Figure 2a). Growth of DH5 α Alb^r was not inhibited by any of the exconjugants of Xcv 91-
6 11BR1. In contrast, growth of DH5 α was inhibited by exconjugants harboring both plasmids
7 pALB571 and pLAFRK7, but not by exconjugants harboring empty vector controls (and
8 therefore missing some albicidin biosynthetic genes) (Figure 2b&c). However, the size of the
9 inhibition zone produced by Xcv 91-11BR1/pALB571/pLAFRK7 (Xves-alb) was smaller
10 than the one produced by *X. albilineans* strain Xa23R1 with cultures of the same age
11 (diameter of growth inhibition zones of 6 and 15 mm, respectively; Figure 2a & b). These
12 data demonstrated that expression of the albicidin biosynthetic genes carried on XALB1,
13 XALB2 and XALB3 in *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* led to the heterologous production of
14 an antibiotic, most likely albicidin, although at a lower level than in *X. albilineans*. The
15 antibiotic produced by Xves-alb inhibited growth of DH5 α , but showed no effect on the
16 growth of DH5 α Alb^r (Figure 2d).

17 **Investigation of new albicidin resistant genes**

18 In order to further characterize cross-resistance between albicidin and the antibiotic
19 heterologously produced by Xves-alb, two candidate albicidin resistance genes found in the
20 XALB1 region (22) were investigated. The first, *albXIV*, encodes a protein similar to
21 characterized multidrug exporters such as the *Streptomyces alboniger* Pur8, conferring
22 resistance to puromycin (27). The second, *albXIX*, encodes a protein similar to *E. coli* *McbG*,
23 involved in self-immunity against the gyrase inhibitor microcin B17 (11). Both genes were
24 PCR amplified, fused with the *lacZ* promoter in pBCKS(+), and moved into DH5 α . Potential

1 albicidin resistance of strain RYC1000/pMR100, harboring the *SbmC* gene previously
2 described as conferring partial resistance to microcin B17 (2), was also investigated. These
3 strains (DH5 α /albXIV, DH5 α /albXIX and RYC1000/pMR100) were completely resistant to
4 143 pg of albicidin but only partially resistant to 1.4 ng of albicidin (Table 2). By comparison,
5 DH5 α /pGEXAlbD harboring the albicidin detoxifying gene *albD* (34) and DH5 α Alb^f were
6 completely resistant to 1.4 ng of albicidin. Similar resistance was observed in bioassays with 4
7 day-old Xa23R1 cultures overlaid with these five tester strains and their corresponding
8 controls (data not shown).

9 **Characterization of the antibiotic activity of Xves-alb**

10 All albicidin resistant strains were assayed for level of resistance against antibiotic activity
11 produced by Xves-alb in order to help confirm that the antibiotic activity was due to albicidin.
12 A resistance pattern similar to the one obtained against isolated albicidin or Xa23R1 cultures
13 was obtained for Xves-alb with the various albicidin resistant and susceptible *E. coli* tester
14 strains (Figure 3). Additionally, several *E. coli* DH5 α clones that spontaneously grew within
15 the growth inhibition zone of Xves-alb were isolated and tested for resistance to albicidin
16 produced by Xa23R1. All these clones were resistant to albicidin in bioassays performed with
17 *X. albilineans* Xa23R1 or with isolated albicidin, confirming cross-resistance between
18 albicidin and the antibiotic heterologously produced by Xves-alb.

19 **DISCUSSION**

20 In this study we report i) the selection of a potential fast growing surrogate host, *X.*
21 *axonopodis* pv. *vesicatoria* strain Xves 91-11BR1, for albicidin heterologous expression
22 based on the level of reporter gene expression in that strain from the *albI* promoter; ii) the
23 transfer into Xves 91-11BR1 of the 22 ORFs previously described in the three albicidin
24 biosynthetic regions, creating Xves-alb; iii) the heterologous production of an antibiotic by
25 Xves-alb, and iv) cross-resistance of various *E. coli* strains between albicidin and this

1 heterogously produced antibiotic. This study is the first report of a successful heterologous
2 expression of the biosynthetic pathway of albicidin, a potent and novel class of antibiotics.

3 The biosynthesis of albicidin involves expression of genes encoding a predicted
4 complex of more than one mega Dalton (based on the predicted size of the product of the
5 three albicidin structural genes from *X. albilineans*), harboring at least 24 active sites, eight of
6 which being post-translationally pantetheinylated (22). Transferring the albicidin biosynthetic
7 genes under the control of their own promoters on low copy plasmid vectors permitted
8 appropriate stoichiometry and kinetics of expression of the different components of the
9 complex pathway.

10 Considerable work has been published regarding polyketide or nonribosomal peptide
11 biosynthesis (more than hundred reviews on polyketides or nonribosomal peptides have been
12 published to date). Studies generally describe the characterization of a cluster encoding a
13 pharmaceutically relevant polyketide or nonribosomal peptide and its validation by site
14 directed mutagenesis and subsequent complementation of the cluster (15, 24) Heterologous
15 expression of the identified genes has been achieved for an increasing number of polyketides
16 (9, 17), especially in various species of *Streptomyces*, the most prolific genus in term of
17 polyketides production. Similarly, two nonribosomal peptides, the safracin cytotoxin and the
18 bacitracin antibiotic have been successfully expressed in heterologous hosts belonging to the
19 same genus as the strain they originate from (10, 30). Expression of portions of clusters has
20 been reported (9), aiming at deciphering the structure and mechanisms of intermediate
21 transfers between PKS and NRPS (and *vice versa*) and at proving that construction of
22 engineered chimeric hybrid NRPS/PKS was realistic. In term of heterologous expression of
23 entire pathways, the only report to date is the expression in *E. coli* of the model hybrid
24 polyketide/nonribosomal peptide yersiniabactin, a *Yersinia pestis* siderophore (16, 19). To our
25 knowledge, the work presented here is the first study describing the heterologous expression

1 of an entire PKS/NRPS pathway encoding a hybrid polyketide/nonribosomal peptide
2 antibiotic. *albXIV* conferred resistance to albicidin, thus confirming the role of this gene in
3 albicidin export (22). *AlbXIV* is similar to the *S. albiger* Pur8, an efflux pump, probably
4 energized by a proton-dependent electrochemical gradient, which confers resistance to
5 puromycin (27). *albXIX* also conferred resistance to albicidin. *AlbXIX* is similar to the *E. coli*
6 *McbG*, which has been shown to protect DNA gyrase from the action of microcin B17 (2).
7 *AlbXIX* shows tandem five-residue repeats of the motif (A/C)(D/N)(L/F)XX. It therefore
8 belongs to a pentapeptide family, like *Qnr*, a plasmid-borne gene conferring resistance to
9 quinolones, the antibacterial agents targeting bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV (28,
10 29). *albXIV* and *albXIX* confer resistance to lower levels of albicidin compared to *albD*, which
11 encodes the albicidin detoxifying enzyme (34).

12 In this study, cross-resistance of various *E. coli* strains between antibiotics produced
13 by *X. albilineans* (wild type) and *Xves-alb* (engineered heterologous strain) support the
14 hypothesis that albicidin is biosynthesized by *Xves-alb*. However, comparison of the chemical
15 structure of the two molecules will be necessary to confirm that they are identical. To achieve
16 this goal, it will be necessary to produce sufficient amounts of the antibiotics produced by
17 both strains for chemical characterization.

18 In conclusion, this study provides experimental evidence that the entire albicidin biosynthetic
19 machinery has been identified, cloned and transferred to a heterologous host, driving the
20 production of an antibiotic activity similar to that of albicidin. It supports the postulated
21 albicidin biosynthesis model of Royer *et al.* (22). Heterologous expression of the albicidin
22 biosynthetic gene pathway is a milestone in the effort to engineer higher albicidin yields, to
23 determine the structure of this potent antibiotic and to develop novel variants in this new class
24 of antibiotics by metabolic engineering. This work should also enhance efforts to elucidate the
25 role played by albicidin as a key pathogenesis factor in sugarcane leaf scald disease. This in



1 turn might allow better understanding of the relationship between toxin production and the
2 ability of *X. albilineans* to colonize sugarcane, and might yield new strategies to engineer
3 disease resistance in sugarcane.

4 **Acknowledgements:**

5 Eric VIVIEN was supported by a fellowship from the Direction Scientifique of CIRAD. We
6 thank Dr Felipe Moreno for supplying the SbmC producing pMR100 strain, and Dr Lian Hui
7 Zhang for supplying the AlbD albicidin detoxifying enzyme producing *E. coli* strain.

8 REFERENCES

- 9 1. Astua-Monge G., G.V. Minsavage, R.E. Stall, M.J. Davis, U. Bonas, and J.B. Jones.
10 2000 Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv.
11 *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. Mol. Plant Microbe Interact.
12 **13**: 911-921.
- 13 2. Baquero M. R., M. Bouzon, J. Varea, and F. Moreno. 1995. SbmC, a stationary-phase
14 induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA
15 replication inhibitor microcin B17. Mol. Microbiol. **18**: 301-311.
- 16 3. Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease
17 control. Mol Plant Pathol. **2**: 1-11.
- 18 4. Birch, R. G., and S. S. Patil. 1985. U. S. patent 4,525,354. (June 1985).

- 1 5. **Birch, R. G., and S. S. Patil.** 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced
2 by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen.*
3 *Microbiol.* **131**: 1069-1075.
- 4
- 5 6. **Birch, R. G., and S. S. Patil.** 1987. Correlation between albicidin production and chlorosis
6 induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Physiol. Mol.*
7 *Plant. Pathol.* **30**: 199-206.
- 8
- 9 7. **Birch, R. G., and S. S. Patil.** 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces
10 chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol.*
11 *Mol. Plant. Pathol.* **30**: 207-214.
- 12
- 13 8. **De Feyter, R., and D. W. Gabriel.** 1991. Use of cloned DNA methylase genes to increase
14 the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*.
15 *J. Bacteriol.* **173**: 336-342
- 16
- 17 9. **Du, L., C. Sanchez, and B. Shen.** 2001. Hybrid peptide-polyketide natural products:
18 biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab. Eng.* **3**: 78-95.
- 19
- 20 10. **Eppelmann, K., S. Doekel, and M. A. Marahiel.** 2001. Engineered biosynthesis of the
21 peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **276**:
22 34824-34831.
- 23

- 1 11. Garrido M. C., M. Herrero, R. Kolter, and F. Moreno. 1988. The export of the DNA
2 replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **6**: 1853-
3 1862.
- 4
- 5 12. Huang, G., L. Zhang, and R. G Birch. 2001. A multifunctional polyketide-peptide
6 synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*
7 **147**: 631-642.
- 8
- 9 13. Hutchinson, C. R., and R. McDaniel. 2001. Combinatorial biosynthesis in
10 microorganisms as a route to new antimicrobial, antitumor and neuroregenerative drugs.
11 *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2**: 1681-1690.
- 12
- 13 14. Leong, S. A., G. S. Ditta, and D. R. Helinski. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*:
14 Identification of a cloned gene coding for aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium*
15 *meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**: 8724-8730.
- 16
- 17 15. McDaniel, R., M. Welch, and C.R. Hutchinson. 2005. Genetic approaches to polyketide
18 antibiotics 1. *Chem. Rev.* **105**: 543-558.
- 19
- 20 16. Miller D. A., L. Luo, N. Hillson, T. A. Keating, and C. T. Walsh. 2002. Yersiniabactin
21 synthetase: a four-protein assembly line producing the peptide/polyketide hybrid
22 siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **9**: 333-344.
- 23

- 1 17. Pfeifer B. A., S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, and C. Khosla. 2001.
2 Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*.
3 *Science* **291**: 1790-1792.
- 4
- 5 18. Pfeifer, B. A., and C. Khosla. 2001. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts.
6 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 106-118.
- 7
- 8 19. Pfeifer, B. A., C. C. Wang, C. T. Walsh, and C. Khosla. 2003. Biosynthesis of
9 Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using *Escherichia coli* as a
10 heterologous host. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6698-66702.
- 11
- 12 20. Rott, P. C., L. Costet, M. J. Davis, R. Frutos, and D. W. Gabriel. 1996. At least two
13 separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J.*
14 *Bacteriol.*, **178**: 4590-4596.
- 15
- 16 21. Rott, P., and M. J. Davis. 2000. Leaf scald, p. 38. *In* P. Rott, R. A. Bailey, J. C.
17 Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally (ed.), *A guide to sugarcane diseases*. La
18 librairie du Cirad, Montpellier.
- 19
- 20 22. Royer, M., L. Costet, E. Vivien, M. Bes, A. Cousin, A. Damais, I. Pieretti, A. Savin, S.
21 Megessier, M. Viard, R. Frutos, D. W. Gabriel, and P. C. Rott. 2004. Albicidin
22 pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and
23 NRPS genes present in a gene cluster containing also several putative modifying,
24 regulatory and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Int.* **17**: 414-427.
- 25

- 1 23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory
2 Manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 3
- 4 24. Schwarzer, D., R. Finking, and M. A. Marahiel. 2003. Nonribosomal peptides: from
5 genes to products. Nat. Prod. Rep. **20**: 275-87.
- 6
- 7 25. Staskawicz, B., D. Dahlbeck, N. Keen, and C. Napoli. 1987. Molecular characterization
8 of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.
9 J. Bacteriol. **169**: 5789-5794.
- 10
- 11 26. Symmank, H., W. Saenger, and F. Bernhard. 1999. Analysis of engineered
12 multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase
13 domains in hybrid bimodular systems. J. Biol. Chem. **274**: 21581-21588.
- 14
- 15 27. Tercero J. A., R. A. Lacalle, and A. Jimenez. 1993. The *pur8* gene from the *pur* cluster
16 of *Streptomyces alboniger* encodes a highly hydrophobic polypeptide which confers
17 resistance to puromycin. Eur. J. Biochem. **218**: 963-971.
- 18
- 19 28. Tran, J. H., and G. A. Jacoby. 2002. Mechanism of plasmid mediated quinolone
20 resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 5638-5642.
- 21
- 22 29. Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2005. Interaction of the Plasmid-Encoded
23 Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. Antimicrob. Agents
24 Chemoth. **49**: 118-125.
- 25

- 1 30. Velasco, A., P. Acebo, A. Gomez, C. Schleissner, P. Rodriguez, T. Aparicio, S. Conde,
2 R. Munoz, F. de la Calle, J. L. Garcia, and J. M. Sanchez-Puelles. 2005. Molecular
3 characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2:
4 designing new cytotoxic compounds. *Mol. Microbiol.* **56**: 144-154.
5
- 6 31. Vivien E., S. Megessier, I. Pieretti, S. Cociancich, R. Frutos, D. W. Gabriel, P. C.
7 Rott, and M. Royer. 2005. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of
8 the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* In press. *Available online*
9 *13 August 2005.*
10
- 11 32. Walsh, C.T. 2004. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and
12 versatility. *Science* **303**: 1805-1810.
13
- 14 33. Waugh, A. C., and P. F. Long. 2002. Prospects for generating new antibiotics. *Sci. Prog.*
15 **85**: 73-88.
16
- 17 34. Zhang, L., and R. G. Birch. 1997. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea*
18 *dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to
19 sugarcane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9984-9989.
20
- 21 35. Zhang, L., Xu, J., and R. G. Birch. 1999. Engineered detoxification confers resistance
22 against a pathogenic bacterium. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1021-1024.
23
24
25

1 Table 1 : Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or source ^b
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F-f80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco-BRL
DH5 α Alb ^f	Spontaneous albicidin resistant derivative of DH5 α	This study
RYC 1000	AraD139 Δ <i>lac</i> U169 <i>rspL relA thiA recA56</i>	(2)
<i>X. albilineans</i>		
Xa23	Wild type from sugarcane (Florida)	(20)
Xa23R1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xa23	"
<i>X. axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i>		
Xves 91-11B		(1)
Xves 91-11BR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xves 91-11B	This study
Other xanthomonads		
Xcc	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CFBP 5251
XccR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xcc	This study
Xpru 17	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	CFBP 6653
XpruR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xpru 17	This study
Xpop 50	<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	CFBP 3123
XpopR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xpop 50	This study
Xjug 84	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	CFBP 176
XjugR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xjug 84	This study
Xcor 38	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	CFBP 1846
XcorR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xcory 38	This study
Xfra 98	<i>X. fragariae</i>	CFBP 3548
XfraR1	Spontaneous Rif ^r derivative of Xfra 98	This study
Plasmids		
pBCKS(+)	ColE1 replicon, LacZ α , Cm ^r	Stratagene
pSP-luc+	promoterless firefly luciferase orf, Am ^r	Promega
pGEX-4T-3	GST gene fusion vector, Am ^r	Pharmacia
pGSTAlbD	AlbD 705 bp orf in fusion to GST, Am ^r	(34)
pRK2073	pRK2013 derivative, Km ^s (<i>npt::Tn7</i>), Sp ^r , Tra ⁺ , helper plasmid	(14)
pUFR043	IncW Mob ⁺ LacZ α , Gm ^r , Km ^r , Cos	(8)
pUFR053	IncW Mob ⁺ LacZ α , Gm ^r , Cm ^r , Cos	"
pLAFR3	IncP Mob ⁺ LacZ α , Tc ^r , Cos	(25)
pALB389	37 kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	(22)
pALB540	47 kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	(20)
pALB571	36.8 kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	"
pALB639	36 kb insert from Xa23R1 in pUFR043, Gm ^r , Km ^r	"
pGEXAlbD	AlbD orf from <i>Pantoea dispersa</i> in fusion with <i>lacZ</i> in pGEX, Am ^r	(34)
pMR100	4.3 kb <i>Eco</i> RI fragment from <i>E. coli</i> in pUC19, Am ^r , harbors <i>sbmC</i>	(2)
pLAFRK7	19.1kb <i>Xho</i> I fragment from Xa23RI in pLAFR3, Tc ^r	This study
pBCAlbXIV	<i>albXIV</i> orf in fusion with <i>lacZ</i> in pBCKS(+), Am ^r	"
pBCAlbXIX	<i>albXIX</i> orf in fusion with <i>lacZ</i> in pBCKS(+), Am ^r	"
pAlbILuc	206 bp fragment from Xa23RI cloned in pSP-luc+, Am ^r	"

2

3

^aAm^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Rif^r, Sp^r, Tc^r: resistant to ampicillin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, rifampicin, spectinomycin, tetracycline, respectively.

4

^bCFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA Angers, France

5

6

7

Table 2: Albicidin resistance of *E. coli* harboring different albicidin resistance genes. The bioassays were performed with isolated albicidin.

Tester strain	Area of the growth inhibition ring (mm ²) ^a	
	143 µg albicidin	1.4 ng albicidin
<i>E. coli</i> DH5α	252 ± 20	509 ± 2
<i>E. coli</i> DH5α Alb ^r	0	0
<i>E. coli</i> DH5α pBCKS(+)	163 ± 9	446 ± 16
<i>E. coli</i> DH5α pBCAlbXIV	0	240 ± 10
<i>E. coli</i> DH5α pBCAlbXIX	0	273 ± 12
<i>E. coli</i> DH5α pGEX-4T-3	293 ± 2	576 ± 6
<i>E. coli</i> DH5α pGEXAlbD	0	0
<i>E. coli</i> RYC 1000 pUC19	120 ± 9	325 ± 14
<i>E. coli</i> RYC 1000 pMR100	0	46 ± 10

^aData are the mean and standard deviation of three replicates.

1
2 **FIGURE LEGENDS**

3 **Figure 1: Normalized luciferase activity driven by the promoter of *albI* in different**
4 **bacterial strains.**

5 +: transformed with pAlbILuc, -: transformed with control pUFR053 empty vector. Data are
6 means and standard errors of two separate experiments with duplicate measurements. **a:**
7 Comparison between different xanthomonads. Xalb: *X. albilineans* Xa23R1, Xves: *X.*
8 *axonopodis* pv. *vesicatoria* Xves 91-11BR1, Xcc: *X. campestris* pv. *campestris* XccR1, Xfra:
9 *X. arboricola* pv. *fragariae* XfraR1, Xpru: *X. arboricola* pv. *pruni* XpruR1, Xcor: *X.*
10 *arboricola* pv. *corylinea* XcorR1, Xjug: *X. arboricola* pv. *juglandis* XjugR1, Xpop: *X.*
11 *arboricola* pv. *populi* XpopR1. **b:** Comparison between *E. coli* DH5 α (*Ecol*) and *X.*
12 *albilineans* Xa23R1(Xalb).

13 **Figure 2: Albicidin bioassays**

14 **a :** Albicidin inhibition ring surrounding a spot of Xa23R1 on SPA medium; spontaneous
15 albidin resistant *E. coli* colonies are visible growing in the outer part of the inhibition ring
16 (black arrowhead). **b:** Bioassay with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* transformed with
17 pALB571 and pLAFRK7 (Xves-alb); spontaneous albidin resistant *E. coli* clones are
18 growing in the outer part of the inhibition ring (black arrowhead). **c:** Bioassay with eight day
19 old culture of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* Xves91-11BR1 transformed with pUFR043 and
20 pLAFR3 (negative control) **d:** Eight day old culture of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* Xves91-
21 11BR1 transformed with pALB571 and pLAFRK7 and overlaid with a suspension of *E. coli*
22 DH5 α (right half of the Petri dish) or with a suspension of *E. coli* DH5 α Alb^f (left half of the
23 Petri dish) in 0.75% Noble Agar; suspensions were separated by a sterile plastic spacer
24 inserted in the solid culture medium prior to pouring the top agar.

25

26

1 **Figure 3: Analysis of resistance of *E. coli* tester strains to the antibiotic produced by**
 2 **Xves-alb.** Nine *E. coli* strains presenting variable albicidin resistance phenotypes were used
 3 as tester strains. All bioassays were performed in triplicate. **a:** Comparison between *E. coli*
 4 DH5 α (DH5 α wt, sensitive to albicidin) and a spontaneous albicidin resistant mutant, isolated
 5 from an inhibition ring of Xa23R1. (DH5 α Alb^r); **b:** Effect of *albXIV* and *albXIX*, the two
 6 albicidin resistance genes identified in XALB1: pBC = *E. coli* DH5 α transformed with
 7 pBCKS(+) empty vector; pBCAlbXIV = *E. coli* DH5 α transformed with pBCAlbXIV,
 8 expressing *albXIV*, the albicidin efflux pump gene (22); pBCAlbXIX = *E. coli*
 9 DH5 α transformed with pBCAlbXIX, expressing *albXIX*, the albicidin immunity gene (22);
 10 **c:** Effect of SbmC, the microcin B17 resistance gene: RYC1000 = *E. coli* RYC1000 strain,
 11 transformed with pUC19 empty vector; RYC1000 pMR100 = *E. coli* RYC100 strain,
 12 transformed with SbmC, the microcin B17 resistance gene (2); **d:** Effect of AlbD, the
 13 albicidin detoxifying enzyme: pGEX = *E. coli* DH5 α transformed with pGEX-4-3T empty
 14 vector; pGEXAlbD = *E. coli* DH5 α transformed with pGEXAlbD, expressing *albD*, the
 15 albicidin detoxifying enzyme gene (34).

16



RLU/mg Protein

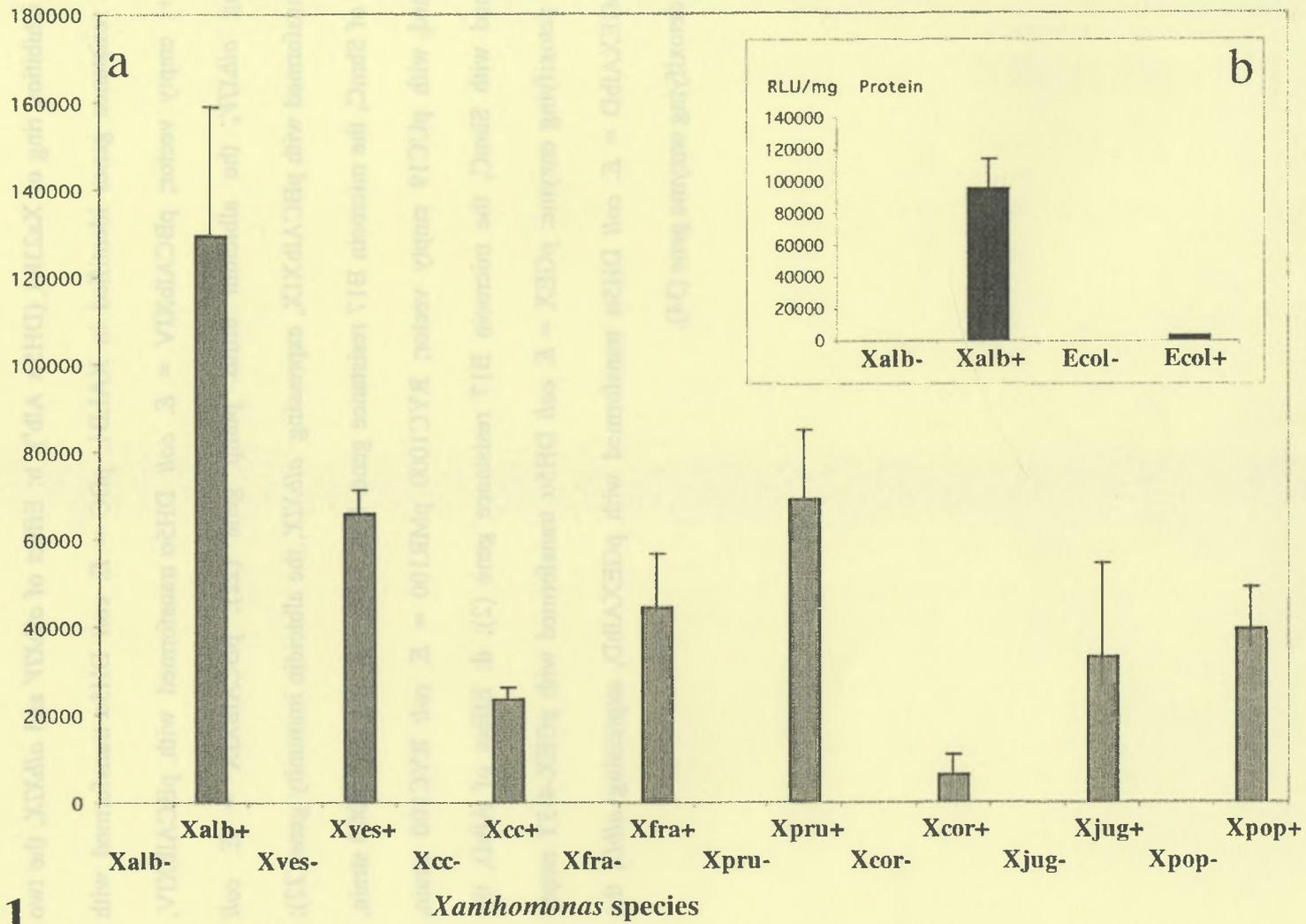


Figure 1

Figure 3

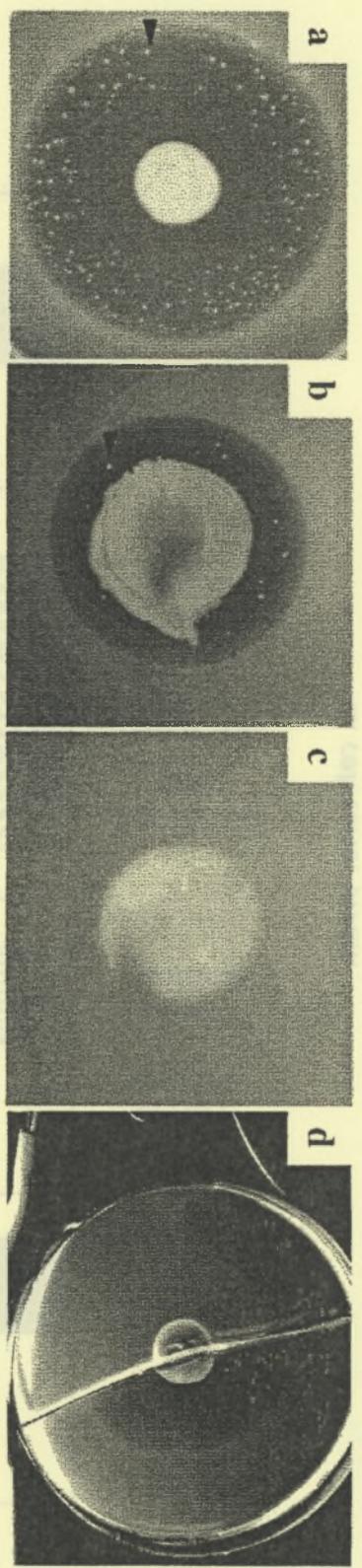
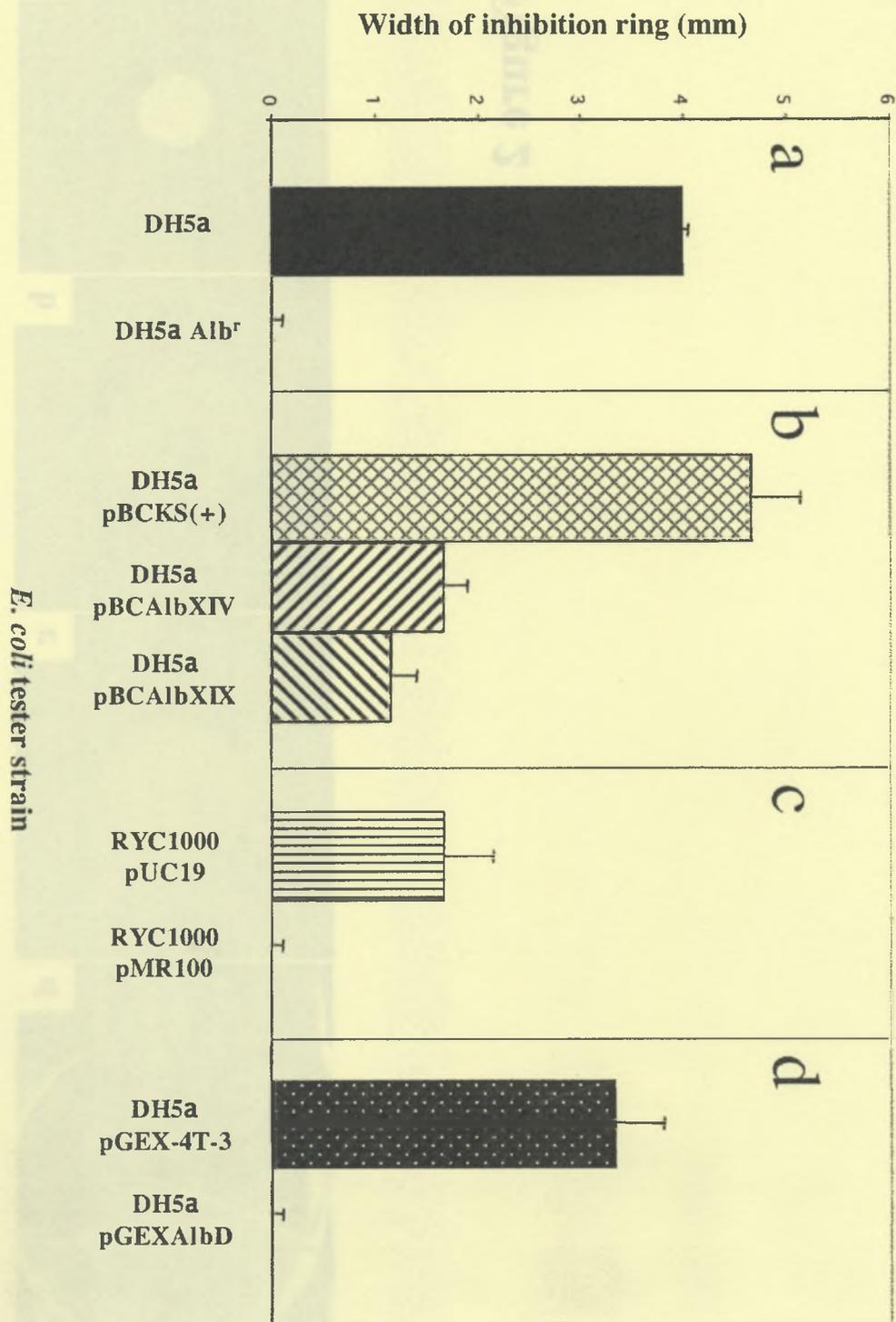


Figure 2



Figure 3



CHAPITRE V :

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude du déterminisme génétique de la biosynthèse de l'albicidine, initiée en 1993 à l'Université de Floride, a permis de mettre en évidence un groupement de gènes de 49 kb ainsi que deux autres régions de 3kb chacune potentiellement impliqués dans la biosynthèse de cette pathotoxine. Leur séquençage a conduit à l'identification de 22 ORFs. Les études de complémentation fonctionnelle ont montré que cinq de ces ORFs (*albl*, *albIV*, *albIX*, *albXXI* et *albXXII*) sont impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. La comparaison des séquences obtenues avec celles des gènes impliqués dans d'autres systèmes de biosynthèse d'antibiotiques a permis d'attribuer à 18 de ces ORFs une fonction et de proposer un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une composition chimique et une structure théoriques de la molécule (Royer, *et al.*, 2004).

1 Conclusions

L'objectif des travaux de thèse était de valider le modèle théorique des voies de biosynthèse de l'albicidine défini par Royer *et al.* (2004). Dans ce cadre, deux approches ont été retenues : i) la caractérisation fonctionnelle de la protéine AlbXXII, dont la séquence présente une forte homologie avec l'HtpG, une protéine de stress d'*E. coli* et ii) la production d'albicidine en système hétérologue. Par ailleurs, la confirmation de l'implication dans la biosynthèse de l'albicidine des trois gènes structuraux *albl*, *albIV* et *albIX* codant pour les PKS et NRPS était préalablement requise à la réalisation des travaux définis dans la thèse.

1.1 Organisation génétique des gènes *albl*, *albIV* et *albIX*

Une analyse par complémentation de six mutants des gènes codant pour les trois PKS/NRPS Albl, AlbIV et AlbIX a été conduite, et leur implication dans la biosynthèse de l'albicidine a été confirmée. Cette confirmation, associée à la caractérisation de l'organisation génétique des gènes *albl*, *albIV* et *albIX* (localisation des promoteurs), a permis de compléter l'article de Royer *et al.* (2004) dont la publication était un pré-requis à la valorisation des futurs résultats de recherche sur la même thématique.

1.2 Caractérisation de la région XALB3

Des tests de complémentation fonctionnelle de mutants du gène *albXXII* de *X. albilineans* avec un fragment d'ADN génomique de 2615 pb ont permis i) de

démontrer que ce gène, dont la séquence a une taille de 1905 pb, est impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine, ii) de localiser le promoteur dans les 542 pb précédant le site d'initiation de la transcription; et iii) de montrer qu'aucun cistron en aval de ce gène n'est requis pour la biosynthèse d'albicidine. Le site d'initiation de la transcription a été localisé par 5' RACE à 53 nucléotides en amont de l'ATG. D'autre part, des tests de complémentation fonctionnelle de trois mutants du gène *albXXII* de *X. albilineans*, avec un fragment d'ADN d'*E. coli* de 1875 pb codant pour la protéine de stress HtpG, ont également permis de rapprocher *albXXII* de cette famille de protéines homologues à la protéine eucaryote Hsp90. Enfin, la protéine HtpG de *X. albilineans* a été localisée au niveau de la membrane de la bactérie, site probable de la biosynthèse de l'albicidine.

La fonction précise d'HtpG dans le métabolisme de l'albicidine demeure cependant à définir. Des expériences préliminaires visant à identifier la protéine client d'HtpG par une approche en double hybride se sont avérées infructueuses. Deux protéines candidates ont été identifiées (AlbII et AlbVI, deux O-Méthyl transférases), mais il n'a pas été possible de confirmer biochimiquement leur interaction *in vitro* avec HtpG. Cet échec pourrait être lié au fait qu'HtpG n'est active que sous forme oligomérique, et que cette forme ne peut être obtenue *in vitro* que par passage à température élevée (5 min, 70°C ; Nemoto, 2001). Ces conditions sont cependant incompatibles avec la purification subséquente d'HtpG sur une colonne d'affinité.

Malgré cette incertitude sur son rôle précis dans la biosynthèse de l'albicidine, l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse concorde avec une implication d'HtpG de *X. albilineans* dans la biosynthèse de l'albicidine.

La caractérisation de la région XALB3 constitue un pas significatif dans la description des gènes de biosynthèse de l'albicidine car elle a permis l'identification de la troisième (et vraisemblablement dernière) région du génome de *X. albilineans* impliquée dans la biosynthèse d'albicidine. En effet, les cinquante mutants *Tox*⁻ générés lors de l'étude initiale par Rott *et al.* en 1993 à l'Université de Floride ont désormais été complétés, et la majorité d'entre eux a été caractérisée. Cette étude de mutagenèse dirigée aléatoire est, à notre connaissance, la seule étude exhaustive par mutagenèse aléatoire des voies de biosynthèse d'un hybride PKS-NRPS conduite à ce jour. En effet, la plupart des études portant sur de nouvelles voies de biosynthèse par PKS et/ou NRPS visent i) à identifier une mégasynthase à l'aide d'amorces PCR dégénérées ciblant un domaine conservé des PKS/NRPS ; ii)

à obtenir un mutant de la PKS/NRPS ciblée, par mutagenèse dirigée à l'aide du produit PCR ; iii) à identifier les gènes de biosynthèse par complémentation du mutant ainsi obtenu avec une banque génomique ; iv) à caractériser le groupement de gène identifié et enfin, v) dans quelques cas, à transférer le groupement de gène identifié dans un hôte hétérologue afin d'obtenir la biosynthèse du PK/NRP par cet hôte. Cette stratégie « classique » permet d'identifier des groupements de gènes contenant un ou plusieurs PKS et/ou NRPS. En revanche, cette stratégie ne permet pas d'identifier d'autres gènes éventuellement impliqués dans la biosynthèse d'un métabolite secondaire par ces mégasynthèses. C'est peut-être pour cette raison qu'aucune molécule chaperon (même putative) n'a jamais été identifiée dans la maturation des PKS et des NRPS, alors que le repliement de mégaprotéines de cette taille (plusieurs centaines de kDa) et leur modification post traductionnelle sont susceptibles de requérir l'intervention de telles fonctions (Pfeifer & Khosla, 2001). La production de variants chimériques de la surfactine synthétase de *B. subtilis* chez *E. coli* est augmentée d'un facteur 50 par la co-expression de la chaperonne GroE/GroS, ce qui conforte cette hypothèse (Symmank *et al.*, 1999). En conséquence, les travaux de thèse concernant la caractérisation de la région XALB3 pourraient constituer la première mise en évidence de l'implication d'une protéine chaperonne (à la fonction néanmoins imprécise), dans la biosynthèse d'une toxine bactérienne de type hybride polycétide-peptide non ribosomal.

1.3 Production d'albicidine en système hétérologue

Deux plasmides comportant l'ensemble des ORFs identifiées dans les régions XALB1, XALB2 et XALB3 ont été transférés dans des hôtes hétérologues (*E. coli* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) et les transformants ont été criblés pour la production d'albicidine. La biosynthèse d'un métabolite secondaire toxique pour *E. coli* a été obtenue dans le système hétérologue *X. vesicatoria*. La preuve formelle que ce métabolite est bien de l'albicidine ne pourra être apportée qu'après purification et identification de la structure de celle-ci qui est hors du cadre de la présente thèse. Néanmoins, un certain nombre d'arguments plaident en faveur de la production d'albicidine chez les transformants de *X. vesicatoria* : i) seuls les clones de *X. vesicatoria* transformés avec le système comportant l'ensemble des gènes de biosynthèse de l'albicidine produisent un métabolite secondaire toxique pour *E. coli* (les autres combinaisons de plasmides ne conduisent pas à la production de ce

produit toxique), ii) il existe une résistance croisée entre le métabolite produit par les transformants et l'albicidine pour une série de souches d'*E. coli* transformées avec un gène de résistance à l'albicidine (au total, cinq gènes de résistance différents ont été testés) ; iii) des mutants spontanés de la souche test d'*E. coli* résistants à la molécule produite par les transformants de *X. vesicatoria* présentent une résistance croisée à l'albicidine produite par *X. albilineans*, iv) la présence des constructions chez les transformants de *X. vesicatoria* producteurs a été confirmée par Southern blot. En revanche, la biosynthèse de la toxine n'a pas pu être obtenue chez *E. coli*, probablement à cause de la non-fonctionnalité du promoteur du gène *abl* dans cet hôte hétérologue. La biosynthèse d'albicidine en système hétérologue apporte la preuve de l'identification de l'ensemble des gènes de biosynthèse de l'albicidine. L'intervention dans cette voie de biosynthèse de certains gènes de ménage communs à d'autres *Xanthomonas* ou d'autres espèces bactériennes ne peut toutefois pas être exclue.

2 Perspectives

Malgré la validation du modèle de biosynthèse de l'albicidine, la structure de la toxine demeure inconnue et ne pourra être résolue qu'avec la production et la purification de grosses quantités d'albicidine. L'obtention de grandes quantités d'albicidine purifiée est également un pré requis à l'utilisation de cette toxine à des fins thérapeutiques après caractérisation de l'activité antibiotique voire d'autres activités biologiques éventuelles (anti-prolifératif, anti-cancéreux, etc.).

2.1 Surexpression d'albicidine

La caractérisation des bases génétiques de la biosynthèse de l'albicidine, ainsi que l'obtention d'un système de production hétérologue, permettent d'envisager la manipulation des goulots d'étranglement limitant la production de toxine et devraient à terme déboucher sur un système de surproduction de l'albicidine. Diverses pistes qui pourraient aboutir à la surproduction d'albicidine peuvent être envisagées :

- i) Transfert de l'ensemble des gènes de biosynthèse vers un autre hôte hétérologue à la biologie mieux caractérisée. L'espèce *Streptomyces*, qui est l'hôte naturel de nombreuses PKS et qui constitue l'espèce pour laquelle la production de métabolites secondaires de ce type est la mieux caractérisée constitue une excellente candidate. Toutefois, la vérification préalable de

l'activité des promoteurs des gènes de biosynthèse de l'albicidine chez cette espèce est nécessaire. Le système reporter Luciférase, sous le contrôle du promoteur du gène *abl* (Vivien, 2005b) constitue un outil de choix pour le criblage de nouveaux hôtes hétérologues potentiels.

- ii) Augmentation du nombre de copies des gènes de biosynthèse chez *X. albilineans*. De façon surprenante, il n'a pas été possible de transférer l'ensemble des gènes de biosynthèse de l'albicidine (sous la forme pALB571 et pLAFRK7) à *X. albilineans*, alors que les combinaisons "pALB571 et pLAFR3" ou "pUFR043 et pLAFRK7" ainsi que "pUFR043 et pLAFR3" l'étaient facilement. Ces données reflètent vraisemblablement la contre-sélection de l'événement de transformation par un effet toxique de surproduction d'albicidine.
- iii) Insertion des gènes de biosynthèse de l'albicidine dans le génome de *X. axonopodis* pv *vesicatoria*. L'avantage de cette insertion est que les gènes de biosynthèse de l'albicidine se trouveraient sous une copie unique, ce qui pourrait permettre une régulation mieux coordonnée entre les 22 gènes décrits dans notre étude. Cette insertion permettrait d'abandonner la pression de sélection antibiotique sur les deux constructions initialement utilisés. De plus, l'abandon de cette pression de sélection sur les gènes de biosynthèse de l'albicidine en système hétérologue pourrait permettre d'analyser *in planta* l'effet de la production d'une phytotoxine par un agent phytopathogène n'en produisant normalement pas (ex *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* / poivron). Enfin, l'insertion des gènes de biosynthèse de l'albicidine pourra également être effectuée dans le génome d'autres hôtes hétérologues potentiels, notamment appartenant à l'espèce *Streptomyces*.
- iv) Surexpression de AlbXIV, la pompe d'efflux de l'albicidine. L'accumulation d'albicidine par *X. albilineans* pourrait avoir un effet répresser sur la production d'albicidine (régulation en feed back). La surexpression d'AlbXIV sous promoteur constitutif pourrait, par conséquent, être un moyen de court-circuiter cette étape limitante.
- v) Surexpression d'un activateur transcriptionnel afin d'augmenter le niveau d'expression des gènes de biosynthèse de l'albicidine.

- vi) Suppression des régulations post transcriptionnelles par ingénierie génétique, avec en particulier le remplacement des codons d'initiation TTG des gènes *albI* et *albXVII* par des codons ATG.
- vii) Expression constitutive, voire surexpression des enzymes de trans-activation AlbXIII et AlbIV pourrait également permettre de lever les régulations post transcriptionnelles des gènes de biosynthèse de l'albicidine. Cette stratégie a été efficace pour l'expression de la leinamycine, un polycétide dont les six modules PKS sont activés par un domaine AT agissant en trans (Cheng, 2003).
- viii) Co-expression d'une chaperone de type GroES/GroEL avec les gènes de biosynthèse de l'albicidine. Cette stratégie a permis d'augmenter d'un facteur 50 le niveau d'expression de SrfA A, une sous unité de la surfactine synthétase chez *E. coli* (Symmank *et al.*, 1999).

2.2 Elucidation du rôle de l'albicidine dans la pathogénèse

Bien qu'étant un déterminant majeur de la pathogénie de *X. albilineans*, le rôle précis joué par l'albicidine dans l'établissement et la progression de la maladie reste à clarifier. L'obtention de larges quantités d'albicidine purifiée devrait contribuer à faire progresser les connaissances du mode d'action de cette pathotoxine, en permettant notamment l'obtention d'anticorps dirigés contre l'albicidine. Ces anticorps permettront à leur tour de localiser la toxine dans la plante et devraient permettre d'affiner les connaissances quant à l'implication de l'albicidine dans la maladie. Les questions posées concernent en particulier la cinétique de production et de diffusion de la toxine *in planta*, le rôle éventuel joué par l'albicidine dans le contrôle des différentes phases de la maladie (phase de latence, aiguë, ou d'éclipse), en particulier en lien avec l'inhibition du développement des chloroplastes. Enfin, bien que des hypothèses fortes quant à la cible de l'albicidine au niveau du chloroplaste aient été formulées (Birch and Patil, 1987b) l'identification formelle de cette cible *in planta* n'a jamais été conduite et constitue un autre axe de recherche potentiel. D'autre part, la détermination de la cible de l'activité antibiotique de l'albicidine est également un pré-requis à son éventuel développement clinique comme antibiotique.

2.3 Caractérisation des substrats des NRPS

Il existe une très forte spécificité de chaque module de NRPS pour l'acide aminé incorporé par ce module (cf. chapitre II, paragraphe 1.1.1.1). Cette spécificité est

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



gouvernée par une signature au niveau de la séquence en acides aminés du domaine d'adénylation qui est spécifique d'un acide aminé donné. C'est ainsi que quatre des domaines d'adénylation des NRPS de l'albicidine (NRPS-1 & 3 et NRPS-6 & 7) sont particuliers. En effet, ces domaines présentent une séquence signature divergeant radicalement des séquences signatures répertoriées dans les différents modèles de prédiction des substrats des domaines d'adénylation (Stachelhaus *et al.*, 1999 ; Challis *et al.*, 2000 ; May, 2002). Trois domaines d'adénylation de NRPS impliqués dans la biosynthèse d'albicidine avaient initialement été choisis afin d'être clonés, exprimés, purifiés et utilisés dans un test biochimique permettant l'identification de leur(s) substrat(s). Ces domaines étaient les domaines A des modules NRPS-3 et NRPS-6 spécifiant chacun un substrat original, ainsi que le domaine A de NRPS-5 (contrôle du test biochimique car prédit comme spécifiant l'asparagine). Les constructions comportant un tag histidine en fusion avec NRPS3, NRPS5 et NRPS6 ont été réalisées. Toutefois, la purification de ces protéines en conditions natives n'a pas pu être réalisée (corps d'inclusion). Ainsi, conformément à l'avis du comité de thèse réuni fin 2003, cet axe de recherche initialement inscrit dans le cadre de la thèse a été abandonné.

Néanmoins, la détermination de la nature des substrats activés par ces domaines d'adénylation originaux demeure un axe de recherche important. En effet, l'élucidation de la nature des substrats spécifiés par ces domaines devrait à la fois permettre de lever des incertitudes sur la structure théorique de l'albicidine et de compléter le modèle de biosynthèse de la toxine. Par ailleurs, l'identification de la nature de substrats originaux de NRPS pourrait permettre d'incrémenter les modèles prédictifs de substrats NRPS avec deux substrats originaux, non protéinogènes. Enfin, ces substrats originaux sont susceptibles d'applications en ingénierie métabolique, dans le but d'obtenir des variants structuraux de l'albicidine, mais également d'autres peptides non ribosomiaux.

2.4 Ingénierie métabolique

A plus long terme, les enzymes de biosynthèse de l'albicidine et les produits des gènes de modification de l'albicidine pourront être utilisés en ingénierie métabolique. Ces technologies pourraient permettre de produire des variants structuraux de l'albicidine. Par ailleurs, l'incorporation de domaines PKS ou NRPS de l'albicidine

dans les modules PKS/NRPS d'autres métabolites pourrait permettre d'obtenir des variants structuraux de ces composés.

Toutefois, ces applications requièrent l'élucidation préalable de la structure de l'albicidine, l'identification des substrats incorporés par les différents domaines composant les mégasynthèses AlbI, AlbIV et AlbIX, ainsi que la détermination de la fonction de l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse de la toxine. Les travaux présentés dans ce manuscrit constituent une étape importante dans ces travaux de recherche.

L'optimisme initial généré par la découverte de nombreuses familles d'antibiotiques et leur utilisation massive n'est malheureusement plus d'actualité. Les vingt-cinq dernières années ont vu croître l'émergence de souches bactériennes résistantes voire multirésistantes aux antibiotiques courants. Cette augmentation des niveaux de résistance constitue une menace majeure en termes de santé publique (Chopra *et al.*, 2002) ; la découverte et la caractérisation de nouvelles familles d'antibiotiques revêt par conséquent une importance cruciale. L'obtention de molécules originales avec un mode d'action différent devrait, en effet, considérablement réduire les chances de voir apparaître des résistances croisées avec les mécanismes de résistance existants. Elle devrait aussi offrir quelques années de répit dans le combat mené contre les infections bactériennes.

Dans ce cadre, l'albicidine pourrait se révéler d'un intérêt clinique majeur car cet antibiotique présente une activité bactéricide à l'égard de nombreux germes et ne semble pas toxique pour la cellule eucaryote, du moins aux doses bactéricides (Birch & Patil, 1985). De plus, la structure putative et le mode d'action putatif de l'albicidine semblent originaux. En conséquence, l'identification de l'ensemble des gènes requis pour la biosynthèse de cette toxine constitue une étape clé dans le développement de ce nouvel antibiotique. Les travaux présentés dans ce manuscrit devraient à terme déboucher sur la production de quantités d'albicidine suffisantes pour permettre sa purification, la détermination de sa structure chimique et de son spectre d'action qui sont les prérequis à une utilisation clinique de l'albicidine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références citées dans les trois articles sont listées à la fin de chacun d'eux, et ne figurent par conséquent pas dans la liste ci-dessous (à l'exception des références reprises dans le manuscrit).

Ackerley DF, Caradoc-Davies TT, Lamont IL. 2003. Substrate Specificity of the Nonribosomal Peptide Synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **185** 2848-2855.

Ashby, SF 1929. The bacterium which causes gumming disease of sugarcane with notes on two other bacterial diseases of the same host. *Trop. Agric.* **6** 135-138

August PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Muller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR, Floss HG. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* **5** 69-79.

Aumercier M, Bouhallab S, Capmau ML, Le Goffic F. 1992. RP 59500: a proposed mechanism for its bactericidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **30** Suppl A : 9-14.

Ballio A, Bossa F, Camoni L, Di Giorgio D, Flamand MC, Maraitte H, Nitti G, Pucci P, Scaloni A. 1996. Structure of fuscopeptins, phytotoxic metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. *FEBS Lett.* **381** 213-216.

Bardwell JC, Craig EA. 1988. Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170** 2977-2983.

Beissinger M, Buchner J. 1998. How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* **379** 245-259.

Belshaw PJ, Walsh CT, Stachelhaus T. 1999. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284** 486-489.

Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** 266-292

Bender CL, Liyanage H, Palmer D, Ullrich M, Young S, Mitchell R. 1993. Characterization of the genes controlling the biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid. *Gene* **133** 31-38.

Birch RG. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* **2** 1-11.

- Birch RG, Patil SS. 1983. The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. *Phytopathology* **73** 1368-1374.
- Birch RG, Patil SS. 1985a. Antibiotic and process for the production thereof. U. S. patent 4,525,354.
- Birch RG, Patil SS. 1985b. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131** 1069-1075.
- Birch RG, Patil SS. 1987a. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30** 199-206.
- Birch RG, Patil SS. 1987b. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30** 207-214.
- Birch RG, Pemberton JM, Basnayake WVS. 1990. Stable albicidin resistance in *Escherichia coli* involves an altered outer membrane nucleoside uptake system. *J. Gen. Microbiol.* **136** 51-58.
- Bisang C, Long PF, Cortes J, Westcott J, Crosby J, Matharu AL, Cox RJ, Simpson TJ, Staunton J, Leadlay PF. 1999. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **401** 502-505.
- Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ, Van Gijsegem F. 1996 Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20** 681-683.
- Bostock J. 2000. Molecular analysis of albicidin resistance in *X. albilineans*. Thèse de PhD, Département de botanique, Université du Queensland
- Brisson-Noel A, Trieu-Cuot P, Courvalin P. 1988. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* **22** Suppi B:13-23.
- Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* **30** 10408-10415
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** 1211-1233.

Bussiere DE, Muchmore SW, Dealwis CG, Schluckebier G, Nienaber VL, Edalji RP, Walter KA, Lador US, Holzman TF, Abad-Zapatero C. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* **37** 7103-7112.

Butler AR, Bate N, Cundliffe E. 1999. Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* **6** 287-292.

Cane DE. 1997. A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. *Chem. Rev.* **97** 2463-2706.

Cane DE, Walsh CT. 1999. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6** 319-325.

Cane DE, Walsh CT, Khosla C. 1998. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282** 63-68.

Challis GL, Naismith JH. 2004. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **14** 748-756.

Challis GL, Ravel J, Townsend CA. 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7** 211-224.

Champoiseau P, Daugrois J-H, Girard J-C, Royer M, Rott P, 2005. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*. Sous Presse

Cheng YQ, Tang GL, Shen B. 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** 3149-54.

Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D. 2004. Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov. Today.* **9** 881-888.

Chinault AC, Blakesley VA, Roessler E, Willis DG, Smith CA, Cook RG, Fenwick RG Jr. 1986. Characterization of transferable plasmids from *Shigella flexneri* 2a that confer resistance to trimethoprim, streptomycin, and sulfonamides. *Plasmid* **15** 119-31.

Chopra I. 1985. The tetracyclines *In* Handbook of experimental pharmacology. (Hlawaka II, Boothe IH eds) Vol 78. 317-392. Springer, Berlin.

Chopra I, Hesse L, O'Neill AJ. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **31** 4S-15S.

Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P. 1997. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16** 4174-4183.

Cortes J, Wiesmann KE, Roberts GA, Brown MJ, Staunton J, Leadlay PF. 1995. Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268** 1487-1489.

Costet L, Gagnevin L, Notaise J, Rott P. 2002. Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre à la Réunion. p 67 In: Résumés des Cinquièmes Rencontres de Phytobactériologie. CNRS/INRA, Aussois, France.

Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martinez A, Kolvek SJ, Hopke J, Osburne MS, August PR, Nalin R, Guerineau M, Jeannin P, Simonet P, Pernodet JL. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** 49-55.

Cuppels DA, Ainsworth T. 1995. Molecular and Physiological Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. maculicola Strains That Produce the Phytotoxin Coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** 3530-3536.

Crump MP, Crosby J, Dempsey CE, Parkinson JA, Murray M, Hopwood DA, Simpson TJ. 1997. Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* **36** 6000-6008.

Daugrois JH, Dumont V, Champoiseau P, Costet L, Boisne-Noc R, Rott P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Eur. J. Plant Pathol.* **10** 1-14.

Davis, MJ; Rott, P; Warmuth, CJ; Chatenet, M; Baudin, P 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* **87** 316-324.

Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264** 375-82

Delhaes L, Benoit-Vical F, Camus D, Capron M, Meunier B. 2003. Chloroquine and artemisinin: six decades of research--what next? *IDrugs.* **6** 674-680

Doekel S, Marahiel MA. 2000. Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* **7** 373-384.

von Döhren H, Dieckmann R, Pavela-Vrancic M. 1999. The nonribosomal code. *Chem. Biol.* **6** 273-279.

Dowson, W.J. 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **26** 1-14.

Du L, Chen M, Zhang Y, Shen B. 2003. BImIII and BImIV nonribosomal peptide synthetase-catalyzed biosynthesis of the bleomycin bithiazole moiety involving both in cis and in trans aminoacylation. *Biochemistry* **42** 9731-9740.

Du L, Sanchez C, Chen M, Edwards DJ, Shen B. 2000. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem. Biol.* **7** 623-642.

Du L, Sanchez C, Shen B. 2001. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab. Eng.* **3** 78-95.

Du L, Shen B. 2001. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr. Opin. Drug Discovery & Development* **4** 215-218.

Duflos A, Kruczynski A, Barret JM 2002. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* **2** 55-70

Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 13294-13299.

Dutton CJ, Gibson SP, Goudie AC, Holdom KS, Pacey MS, Ruddock JC, Bu'Lock JD, Richards MK. 1991. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo).* **44** 357-365.

Fekkes P, van der Does C, Driessen AJ. 1997. The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16** 6105-6113.

Fernandez-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, Malpartida F. 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell.* **66** 769-780.

Findlow SC, Winsor C, Simpson TJ, Crosby J, Crump MP. 2003. Solution structure and dynamics of oxytetracycline polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces rimosus*. *Biochemistry* **42** 8423-8433.

- Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of nonribosomal peptides1. 2004. *Annu. Rev. Microbiol.* **58** 453-488.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10** 226-236.
- Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD. 1996. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274** 1367-1371.
- Fraser PD, Bramley PM. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **43** 228-265.
- Gananamaickam SS, Starratt AN, Ward EWB. 1982. Coronatine production in vitro and in vivo and its relation to symptom development in bacterial blight of soybean. *Can. J. Bot.* **60** 645-650.
- Gehring AM, Mori I, Walsh CT. 1998. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **37** 2648-2659
- Gin AS, Zhanel GG. 1996. Vancomycin-resistant enterococci. *Ann. Pharmacother.* **30** 615-624.
- Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, Robe P, Pujic P, Tuphile K, Bertrand H, Vogel TM, Perriere G, Simonet P, Nalin R. 2004. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** 5522-7.
- Goyer C, Vachon J, Beaulieu C. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* **88** 442-445.
- Grayson DH. 2000. Monoterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **17** 385-419.
- Greenwood D, Whitley R. 1997. Modes of action pp11-24 *In* Antibiotic and chemotherapy. 7th ed. Churchill Livingstone,
- Guenzi E, Galli G, Grgurina I, Gross DC, Grandi G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* **273** 32857-32863.
- Gokhale RS, Tsuji SY, Cane DE, Khosla C. 1999. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284** 482-485.
- Gokhale RS, Khosla C. 2000. Role of linkers in communication between protein modules. *Curr. Opin. Chem Biol.* **4** 22-7.

Hanson JR. Natural Products: The Secondary Metabolites. 2003. The Royal Society of Chemistry. Cambridge

Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, Gibson DM, Loria R. 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38** 794-804.

Healy FG, Lambert DH. 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41** 479-482

Hutchison ML, Tester MA, Gross DC. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8** 610-620.

Jacobsen JR, Cane DE, Khosla C. 1998. Spontaneous priming of a downstream module in 6-deoxyerythronolide B synthase leads to polyketide biosynthesis. *Biochemistry* **37** 4928-4934.

Johnson HW, Means UM, Clark FE. 1959. Responses of seedlings to extracts of soybean nodules bearing selected strains of *Rhizobium*. *Nature* **183** 308-309.

Kao CM, Katz L, Khosla C. 1994. Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science* **265** 509-12.

Kao CM, Luo G, Katz L, Cane DE, Khosla C. 1995. Manipulation of macrolide ring size by directed mutagenesis of a modular polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 9105-9106

Konig A, Schwecke T, Molnar I, Bohm GA, Lowden PA, Staunton J, Leadlay PF. 1997. The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin--nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur. J. Biochem.* **247** 526-34.

Keating TA, Walsh CT. 1999. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** 598-606.

Keating TA, Marshall CG, Walsh CT, Keating AE. 2002. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* **9** 522-6.



- Keatinge-Clay AT, Shelat AA, Savage DF, Tsai SC, Miercke LJ, O'Connell JD 3rd, Khosla C, Stroud RM. 2003. Catalysis, specificity, and ACP docking site of *Streptomyces coelicolor* malonyl-CoA:ACP transacylase. *Structure (Camb)*. **11** 147-154.
- Knight TJ, Durbin RD, Langston-Unkefer PJ. 1986. Role of glutamine synthetase adenylation in the self-protection of *Pseudomonas syringae* subsp. "tabaci" from its toxin, tabtoxinine-beta-lactam. *J. Bacteriol.* **166** 224-229.
- Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS. 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* **294** 93-101.
- Konz D, Klens A, Schorgendorfer K, Marahiel MA. 1997. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetase. *Chem. Biol.* **4** 927-937.
- Khosla C, Gokhale RS, Jacobsen JR, Cane DE. 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **68** 219-53.
- Lai CJ, Weisblum B, Fahnestock SR, Nomura M. 1973. Alteration of 23 S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **74** 67-72.
- Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT. 1996. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3** 923-936.
- Lambert MP, Neuhaus FC. 1972. Mechanism of d-Cycloserine Action: Alanine Racemase from *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **110** 978-987.
- Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275** 416-420.
- Laskowska E, Wawrzynow A, Taylor A. 1996. IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie* **78** 117-22.
- Lautru S, Challis GL. 2004. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* **150** 1629-1636.
- Lecker SH, Driessen AJ, Wickner W. 1990. ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.* **9** 2309-2314.

- Lee KH. 1999. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *J. Biomed. Sci.* **6** 236-250.
- Leite RP, Minsavage GV, Bonas U, Stall RE. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** 1068-1077.
- Levy SB. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** 695-703.
- Li YM, Milne JC, Madison LL, Kolter R, Walsh CT. 1996. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274** 1188-1193.
- Liou GF, Khosla C. 2003. Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** 279-284.
- Luirink J, den Hagen-Jongman CM, van der Weijden CC, Oudega B, High S, Dobberstein B, Kusters R. 1994. An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *EMBO J.* **13** 2289-2296.
- Lund PA. 2001. Microbial molecular chaperones. *Adv. Microb. Physiol.* **44** 93-140.
- McDaniel R, Kao CM, Hwang SJ, Khosla C. 1997. Engineered intermodular and intramodular polyketide synthase fusions. *Chem. Biol.* **4** 667-674.
- McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, Fu H, Betlach M, Ashley G. 1999. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 1846-1851
- McGarvey DJ, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7** 1015-1026
- Mao Y, Varoglu M, Sherman DH. 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol.* **6** 251-263
- Marahiel MA. 1997. Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **4** 561-567.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97** 2651-2673.

- Marsden AF, Wilkinson B, Cortes J, Dunster NJ, Staunton J, Leadlay PF. 1998. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* **279** 199-202.
- Marshall CG, Hillson NJ, Walsh CT. 2002. Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry* **41** 244-250.
- Martin JP, Robinson PE. 1961. Leaf scald. pp.79-107. In Sugarcane diseases of the world. Vol 1. Martin JP, Abbott EV, Hughes CG (eds) Elsevier publishing group, Amsterdam
- May JJ, Kessler N, Marahiel MA, Stubbs MT. 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 12120-12125.
- Menzella HG, Reid R, Carney JR, Chandran SS, Reisinger SJ, Patel KG, Hopwood DA, Santi DV. 2005 Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes. *Nat. Biotechnol.* Published online August 14
- Mitchell RE. 1976. Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry* **15** 1941-1947.
- Mitchell RE. 1985. Coronatine biosynthesis: incorporation of L-[U-14C]isoleucine and L-[U-14C]threonine into the 1-amido-1-carboxy-2-ethylcyclopropyl moiety. *Phytochemistry* **24** 247-249.
- Mitchel RE, Young H. 1985. N-coronafacoyl-L-isoleucine and N-coronafacoyl-L-alloisoleucine, potential biosynthetic intermediate of the phytotoxin coronatine. *Phytochemistry* **24** 2716-2717.
- Moore BS, Hertweck C. 2002. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.* **19** 70-99.
- Moore BS, Hopke JN. 2001. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chem. biochem.* **2** 35-38.
- Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. 2000. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 5848-5853.
- Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chem. biochem.* **3** 490-504.

Nakano MM, Corbell N, Besson J, Zuber P. 1992. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **232** 13-21.

Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E. 1999. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest. New Drugs.* **17** 361-73.

Nemoto T, Ono T, Tanaka K. 2001. Substrate-binding characteristics of proteins in the 90 kDa heat shock protein family. *Biochem. J.* **354** 663-670.

North, D.S. Leaf-Scald, a Bacterial Disease of Sugarcane. 1926. Sydney: The Colonial Sugar Refining Co.

Offenzeller M, Santer G, Totschnig K, Su Z, Moser H, Traber R, Schneider-Scherzer E. 1996. Biosynthesis of the unusual amino acid (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-methyl-L-threonine of cyclosporin A: enzymatic analysis of the reaction sequence including identification of the methylation precursor in a polyketide pathway. *Biochemistry* **35** 8401-8412.

Orian, G. Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. 1942. *Rev. Agric. Sucr. Ile Maurice* **21**. 285-304.

Otten SL, Gallo MA, Madduri K, Liu X, Hutchinson CR. 1997. Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* dnmZUV genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. *J. Bacteriol.* **179** 4446-4450.

Paitan Y, Alon G, Orr E, Ron EZ, Rosenberg E. 1999. The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J. Mol. Biol.* **286** 465-74.

Paitan Y, Orr E, Ron EZ, Rosenberg E. 1999. Genetic and functional analysis of genes required for the post-modification of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **145** 3059-3067.

Patel HM, Tao J, Walsh CT. 2003. Epimerization of an L-cysteinylyl to a D-cysteinylyl residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **42** 10514-10527.

Patel SS, Balfour JA, Bryson HM 1997. Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs* **53** 637-656.

- Peet RC, Lindgren PB, Willis DK, Panopoulos NJ. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola". *J. Bacteriol.* **166** 1096-1105.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** 553-63.
- Pfeifer BA, Khosla C. 2001. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65** 106-18.
- Pfeifer BA, Wang CC, Walsh CT, Khosla C. 2003. Biosynthesis of Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** 6698-702.
- Porankiewicz J, Wang J, Clarke AK. 1999. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* **32** 449-458.
- Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT. 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37** 1585-1595.
- Rawlings BJ. 1999. Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat. Prod. Rep.* **16** 425-484.
- Rawlings BJ. 2001a. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A--erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18** 190-227.
- Rawlings BJ. 2001b. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (part B). *Nat. Prod. Rep.* **18** 231-281.
- Ricaud C, Ryan CC. 1989. Leaf scald. pp. 39 -53. *In: Diseases of Sugarcane: Major Diseases.* (Ricaud, C., Egan, B.T., Gillaspie, A.G. Jr and Hughes, C.G., eds). Amsterdam: Elsevier.
- Rix U, Fischer C, Remsing LL, Rohr J. 2002. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **19** 542-580.
- Rott P. 1995. Leaf scald of sugarcane. *Agriculture et développement, numéro spécial*, 47-54.
- Rott P, Chatenet M, Baudin P. 1995. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. I. Synthèse bibliographique. *L'Agronomie tropicale* **43** 236-243.

Rott P, Davis MJ. 1996. Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. In Proceedings XXII Congress of the International Society of Sugarcane Technologists, Cartagena De Indias, Colombia, 5-14 September, Cock J.H. and Brekelbaum T. (Eds), vol. 2, 498-504.

Rott R, Davis, MJ. 2000. Leaf scald. Page 38 In: A guide to sugarcane diseases. (Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS eds). Montpellier : la librairie du CIRAD

Rott P, Abel M, Soupa D, Feldmann P, Letourmy P. 1994. Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic resistant mutant. *Plant Dis.* **78** 241-247.

Rott PC, Costet L, Davis MJ, Frutos R, Gabriel DW. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* **178** 4590-4596.

Royer M, Costet L, Vivien E, Bes M, Cousin A, Damais A, Pieretti I, Savin A, Megessier S, Viard M, Frutos R, Gabriel, D.W. Rott PC. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Int.* **17** 414-427.

Schindler PR, Teuber M. 1975. Action of polymyxin B on bacterial membranes: morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **8** 95-104.

Schneider TL, Shen B, Walsh CT. 2003. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry* **42** 9722-9730.

Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Lu SE, Grgurina I, Gross DC. 2001. A physical map of the syringomycin and syringopeptin gene clusters localized to an approximately 145-kb DNA region of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14** 1426-1435.

Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Gross DC. 2003. The *sypA*, *sypB*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16** 271-280.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* **28** 519-542.

Segre A, Bachmann RC, Ballio A, Bossa F, Grgurina I, Iacobellis NS, Marino G, Pucci P, Simmaco M, Takemoto JY. 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* **255** 27-31.

Sembdner G, Parthier B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44** 569-580.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57** 138-63.

Shaw-Reid CA, Kelleher NL, Losey HC, Gehring AM, Berg C, Walsh CT. 1999. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6** 385-400.

Sorensen KN, Kim KH, Takemoto JY. 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** 2710-2713.

Shen B. 2000. Biosynthesis of Aromatic Polyketides. *Top. Cur. Chem.* **209** 1 - 51.

Shen LL. 1993. In *Quinolones antibacterial agents*, 2nd Ed (Hooper, DC, Wolfson JS. eds) 77 American society for microbiology, Washington DC.

Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ, Zajac I, Zawada MJ, Bartholomew PT, Gregory WA, Forbes M. 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31** 1791-1797.

Spratt BG, Cromie KD. 1988. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **10** 699-711.

Stachelhaus T, Huser A, Marahiel MA. 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3** 913-921.

Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6** 493-505.

Stachelhaus T, Schneider A, Marahiel MA. 1995. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269** 69-72.

Stassi DL, Kakavas SJ, Reynolds KA, Gunawardana G, Swanson S, Zeidner D, Jackson M, Liu H, Buko A, Katz L. 1998. Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 7305-7309.

Sriram D, Rao VS, Chandrasekhara KV, Yogeewari P. 2004. Progress in the research of artemisinin and its analogues as antimalarials: an update. *Nat. Prod. Res.* **18** 503-527.

Stein T, Vater J, Kruff V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R, Morris HR. 1996. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271** 15428-15435.

Stevens DL, Dotter B, Madaras-Kelly K. 2004. A review of linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2** 51-59.

Symmank H, Saenger W, Bernhard F. 1999. Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J. Biol. Chem.* **274** 21581-21588.

Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA, Kilburn JO. 1979. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16** 240-242.

Thomas MD., Langston-Unkefer PJ, Uchytel TF, Durbin RD. 1983. Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine--lactam. *Plant Physiol.* **71** 912-915.

Thomas JG, Baneyx F. 2000. ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol.* **36** 1360-70.

Tseng CC, Bruner SD, Kohli RM, Marahiel MA, Walsh CT, Sieber SA. 2002. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* **41** 13350-13359.

Tudzynski P, Correia T, Keller U. 2001. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** 593-605

Turgay KM, Bachmann AS, Marahiel MA, Patil SS. Cloning of a putative peptide synthetase gene involved in the synthesis of phaseolotoxin. 1997. pp 248-254. *In Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Burr TJ, Mansfield JW Stead D, Vivian A, von Kietzel J (eds.). Kluwers academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Turnidge J, Collignon P. 1999. Resistance to fusidic acid. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12** Suppl 2:S35-44.

- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7** 753-764
- Tang L, Shah S, Chung L, Carney J, Katz L, Khosla C, Julien B. 2000. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **287** 640-642.
- Tang L, Fu H, McDaniel R. 2000. Formation of functional heterologous complexes using subunits from the picromycin, erythromycin and oleandomycin polyketide synthases. *Chem. Biol.* **7** 77-84.
- Tran, JH, Jacoby GA, Hooper DC. 2005. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **49** 118-125.
- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K. and Swings, J. 1993. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. pp. 157 – 192. In: *Xanthomonas* (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., eds). London: Chapman & Hall.
- Vining LC. 1990. Functions of Secondary Metabolites *Annual Review of Microbiology* **44** 395-427
- Walter S. 2002. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell. Mol. Life Sci.* **59** 1589-1597
- Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **27** 87-115.
- Waterman PG. Evolution of Secondary Plant Metabolism. In Encyclopedia of life science. <http://www.els.net>
- Weber G, Schorgendorfer K, Schneider-Scherzer E, Leitner E. 1994. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26** 120-125.
- Weber T, Baumgartner R, Renner C, Marahiel MA, Holak TA. 2000. Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold. Des.* **8** 407-18.
- Wilbrink, G. 1920. De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. *Arch. Suikerind. Ned. Indie* **28** 1399-1525
- Williams DH. 1996. The glycopeptide story--how to kill the deadly 'superbugs'. *Nat. Prod. Rep.* **13** 469-77.

Wolf H, Assmann D, Fischer E. 1978. Pulvomycin, an inhibitor of protein biosynthesis preventing ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP, and Aminoacyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** 5324-5328

Xiong K, Fuhrmann JJ. 1996. Comparison of rhizobitoxine-induced inhibition of β -cystathionase from different bradyrhizobia and soybean genotypes. *Plant Soil* **186** 53-61.

Yanagisawa T, Kawakami M. 2003. How does *Pseudomonas fluorescens* avoid suicide from its antibiotic pseudomonic acid?: Evidence for two evolutionarily distinct isoleucyl-tRNA synthetases conferring self-defense. *J. Biol. Chem.* **278** 25887-25894.

Yasuta T, Satoh S, Minamisawa K 1999. New assay for rhizobitoxine based on inhibition of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate synthase. *Appl. Envir. Microbiol.* **65** 849-852.

Yasuta T, Okazaki S, Mitsui H, Yuhashi K, Ezura H, Minamisawa K. 2001. DNA sequence and mutational analysis of rhizobitoxine biosynthesis genes in *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl Envir Microbiol.* **67** 4999-5009.

Yildiz D 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon.* **43** 619-32

Yuhashi K, Ichikawa N, Ezura H, Akao S, Minakawa Y, Nukui N, Yasuta T, Minamisawa K. 2000. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum* *Appl. Envir. Microbiol.* **66** 2658-2663.

Zhao L, Beyer NJ, Borisova SA, Liu HW. 2003. Beta-glucosylation as a part of self-resistance mechanism in methymycin/pikromycin producing strain *Streptomyces venezuelae*. *Biochemistry* **42** 14794-14804

Zhang L, Birch R.G. 1997. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 9984-9989.

Zhang L, Xu J, Birch RG. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat. Biotechnol.* **17** 1021-1024.



RESUME en français :

En inhibant la différenciation des chloroplastes, l'albicidine joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de *Xanthomonas albilineans* sur la canne à sucre. Cette pathotoxine aux propriétés antibiotiques n'est produite qu'en très faible quantité par *X. albilineans*. Sa structure et sa composition chimique sont encore inconnues. Trois régions génomiques (XALB1, XALB2 et XALB3) impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine ont été séquencées. La région XALB1 (49 kb) comprend 20 ORFs et code notamment pour trois mégasynthases appartenant à la famille des polycétides synthases (PKS) et des peptides synthases non ribosomales (NRPS). XALB1 code également pour des gènes putatifs de résistance, de régulation et de modification. La région XALB2 code pour une enzyme responsable de la modification post traductionnelle des PKS et des NRPS. En se basant sur ces données, un modèle de biosynthèse de l'albicidine, ainsi qu'une composition chimique et une structure théoriques du squelette de la molécule, ont été proposés. La région XALB3 comporte également un seul gène de biosynthèse de l'albicidine. Ce gène a été caractérisé par des tests de complémentation fonctionnelle avec la protéine de stress HtpG d'*E. coli*, une protéine homologue à la chaperonne eucaryote Hsp90. L'ensemble des gènes de biosynthèse identifiés a été transféré dans un système hétérologue (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*). La production hétérologue d'albicidine résultant de ce transfert a permis de confirmer que l'ensemble des gènes de biosynthèse de l'albicidine ont été identifiés et pourrait conduire à l'obtention des quantités de toxine suffisantes pour sa caractérisation chimique et chimiothérapeutique. A terme, ces travaux devraient permettre d'obtenir des variants structuraux de ce puissant antibiotique par ingénierie métabolique.

TITRE en anglais

Biosynthesis of albicidin, a pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans*.

RESUME en anglais :

Albicidin is a major pathogenicity factor of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald disease of sugarcane. This pathotoxin, that inhibits chloroplast differentiation and exhibits antibiotic activity, is produced at very low level. Its structure and its chemical composition remain unknown. Three genetic regions involved in albicidin biosynthesis (XALB1, XALB2 and XALB3) were sequenced. XALB1 cluster encodes three megasynthases belonging to polyketide synthetases (PKS) and non ribosomal peptide synthases (NRPS) families, along with several putative resistance, regulation and modification genes. XALB2 region encodes an enzyme responsible for PKS and NRPS post transcriptional modification. Based on these data, an albicidin biosynthesis model was proposed, as well as a putative chemical composition and a theoretical backbone of the toxin. XALB3 region also harbours a single albicidin biosynthesis gene. This gene was characterised by functional complementation using *E. coli* HtpG, a heat shock protein homologous to the eucaryotic Hsp90 molecular chaperone. The whole set of identified biosynthesis genes was transferred to a heterologous host (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*), driving the biosynthesis of albicidin activity. These data confirmed that all the albicidin biosynthetic genes were identified and should result in production of substantial amounts of the toxin in order to characterize its chemical structure and biological properties. These results should in turn allow us to obtain structural analogues of this potent antibiotic by metabolic engineering.

DISCIPLINE : Bactériologie Moléculaire

MOTS-CLES : Antibiotique, polycétide synthétase (PKS), peptide synthétase non ribosomale (NRPS), échaudure des feuilles de la canne à sucre.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

UMR 385 BGPI, Agro. M-CIRAD-INRA
TA 41K Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier cedex 5