

Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles

SZALO I.M., TAMINIAU B., MAINIL J.

Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Bactériologie et Pathologie des Maladies bactériennes, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43A, 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Professeur J. Mainil

Tél.: +32(0)4/366.40.50, fax : +32(0)4/366.42.61, Email : jg.mainil@ulg.ac.be

RESUME : Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant majeur de la surface externe des bactéries Gram négatives. Le LPS est composé de trois entités synthétisées séparément : le lipide A, le noyau et l'antigène O, qui seront, par après, assemblées l'une à l'autre. Le lipide A, enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, le noyau, sa partie médiane, et l'antigène O, sa partie distale « libre » dans le milieu extérieur. Chez les entérobactéries, le lipide A est fortement conservé et le noyau est très peu variable tandis que l'antigène O est la région hypervariable. Plusieurs activités/rôles biologiques ont été associées au LPS, parmi lesquelles l'activité endotoxinique portée par le lipide A et la spécificité antigénique de la souche bactérienne portée par l'antigène O. Ce manuscrit passe en revue l'état des connaissances quant à la structure et la biosynthèse des différents composants du LPS chez *Escherichia coli*, ainsi que de leurs rôles respectifs dans le pouvoir pathogène des bactéries.

1. LES MEMBRANES BACTÉRIENNES

Pour que les bactéries puissent garder leur intégrité et survivre aux conditions du milieu extérieur, elles doivent s'isoler de ce dernier par une enveloppe de plusieurs couches. Cette enveloppe joue à la fois un rôle plastique en donnant une forme à la cellule et un rôle protecteur de barrière biologique permettant et contrôlant les échanges bilatéraux entre la cellule et le milieu extérieur. En plus de cela, dans certains cas, cette enveloppe est le point d'ancrage de nombreuses structures intervenant dans la virulence de la bactérie et interagissant de manière dynamique avec les structures de l'hôte (cellule et/ou matrice extracellulaire).

1.1. La membrane cytoplasmique

Dans la membrane cytoplasmique des bactéries, les molécules de phospholipides sont organisées en une double couche dans laquelle les queues hydrophobes sont orientées vers l'intérieur et les têtes hydrophiles vers l'extérieur. La double couche phospholipidique est traversée par des protéines qui assurent, entre autres, des échanges entre le milieu interne de la cellule et le milieu externe et donnent un aspect de mosaïque à la membrane cytoplasmique. Comme la plus grande majorité des membranes biologiques, la membrane cytoplasmique est semi-perméable, laissant entrer ou sortir certaines substances de manière sélective. La membrane cytoplasmique est aussi le siège de processus d'importation

majeure pour la cellule, comme la respiration, la photosynthèse et la synthèse de composants de la paroi cellulaire (Prescott *et al.*, 2003).

Bien qu'elle assure une certaine stabilité, la membrane cytoplasmique n'est pas suffisante pour assurer aux bactéries une résistance élevée aux modifications des conditions du milieu extérieur. La bactérie a donc développé des couches supplémentaires à l'extérieur de la membrane plasmique.

1.2. La membrane externe

En fonction des propriétés de la paroi bactérienne à la coloration Gram (Gram, 1884), on peut différencier deux grands groupes de bactéries : i) les bactéries à Gram positif (G⁺), possédant une couche épaisse de muréine entourant la bactérie comme

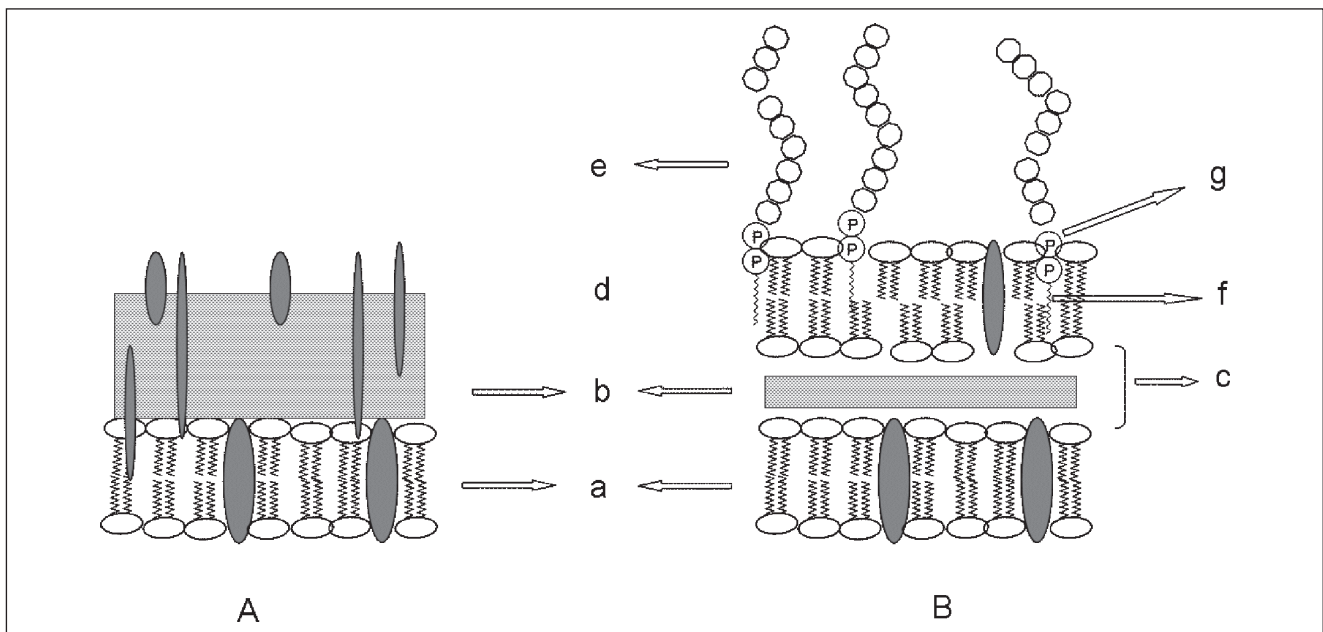


Figure 1 : structure de la membrane des bactéries

A – la paroi de bactéries Gram positives

B – la paroi de bactéries Gram négatives

a – la membrane cytoplasmique

b – la couche de peptidoglycan (plus épaisse chez les bactéries Gram positives)

c – l'espace périplasmique (présente uniquement chez les bactéries Gram négatives)

d – la membrane externe (présente uniquement chez les bactéries Gram négatives)

e – l'antigène O

f – le lipide A

g – le noyau

une armure ; ii) les bactéries à Gram négatif (G^-), entourées d'une couche mince de muréine et d'une seconde membrane lipidique, ou membrane externe. L'espace délimité entre la membrane externe et la membrane plasmique constitue l'espace périplasmique (figure 1).

La membrane externe des bactéries G^- a été découverte dans les années '60 en observant de fines sections d'*Escherichia coli* (*E. coli*) en microscopie électronique (Hancock *et al.*, 1994 ; Nikaido, 1994). Au fil de travaux et observations, l'image de cette membrane externe est passée du stade de ceinture lipidique simple entourant la cellule à celle d'une entité très complexe du point de vue structurel et fonctionnel. Du point de vue fonctionnel, à côté de la membrane cytoplasmique, la membrane externe joue en effet un rôle primordial dans le processus d'échange entre la cellule bactérienne et son environnement. Du point de vue structurel, la membrane externe est une membrane en bicouche lipidique qui contient de nombreuses protéines à fonctions diverses. Elle communique avec la membrane cyto-

plasmique par les « ponts de Bayer » qui représentent des zones de fusion entre les deux membranes.

Les lipides de la membrane externe sont très semblables à ceux de la membrane cytoplasmique. Les protéines de la membrane externe (« Outer Membrane Proteins » ou OMP) se divisent en : i) lipoprotéines, qui donnent une stabilité à la membrane en la liant de manière covalente à la muréine ; ii) porines, qui forment des pores ou canaux, permettant les échanges avec le milieu environnemental, mais qui peuvent aussi servir de récepteurs pour des phages ou des bactériocines ; iii) autres protéines à fonctions structurales, enzymatiques ou impliquées dans la conjugaison plasmidique.

Un composant distal de la membrane externe est représenté par les lipopolysaccharides. Particuliers aux bactéries G^- , les lipopolysaccharides (LPS) sont ancrés dans la couche externe de la membrane externe. Composés de trois parties, le lipide A, le noyau et l'antigène O, les LPS sont responsables d'un ensemble d'activités biologiques, parmi lesquelles l'activité

toxique et la spécificité antigénique de souche. L'activité toxique est due au lipide A qui représente la partie la plus conservée tandis que la spécificité antigénique est due à l'antigène O qui représente la partie la plus variable du LPS. Le but de ce manuscrit est de faire une revue des connaissances sur la structure et la biosynthèse des différentes composantes des LPS chez *E. coli*, ainsi que sur leurs rôles et fonctions, notamment dans le cadre de la membrane bactérienne.

2. LE LIPOPOLYSACCHARIDE DE BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES

Au début du 20^e siècle, une certaine activité toxique des bactéries fut associée à un facteur composé de lipides et carbohydrates. C'est à partir de cette époque que le terme de « lipopolysaccharide » est entré en usage. Cette activité toxique étant liée au corps bactérien, elle fut dénommée endotoxine, par opposition aux exotoxines diphtérique, tétanique et botuliniques connues à l'époque et présentes dans le surnageant de culture (Erridge *et al.*, 2002).

Le lipopolysaccharide (LPS) représente la principale composante non protéique de la membrane externe des bactéries G⁻ et est composé de trois parties : i) le lipide A, situé à la partie proximale du LPS et à l'intérieur de la bicouche lipidique, possède un caractère hydrophobe ; ii) l'antigène O (pour « *Ohne Kapsel* »), situé à la partie distale du LPS, de nature polysaccharidique, possède un caractère hydrophile ; iii) le noyau (ou « *core* ») de nature polysaccharidique représente le pont entre les deux autres parties et est divisé à son tour en deux parties : le noyau interne plutôt hydrophobe et le noyau externe plutôt hydrophile (Nikaido et Vaara, 1987).

Le LPS complet, qui contient donc les trois parties, est connu sous le nom de « *smooth LPS* » ou LPS lisse. Les bactéries possédant ce type de LPS produisent sur milieux solides de culture des colonies de type « *smooth* » ou S, rondes et brillantes à surface bombée et lisse, avec des marges bien délimitées, sans ondulations (Hitchcock *et al.*, 1986 ; Rick et Silver, 1987). En sérum physiologique (0,85 % NaCl), ces colonies donnent une suspension stable avec une turbidité homogène. Lors de culture *in vitro*, les bactéries peuvent produire un LPS qui ne possède pas l'antigène O. Cet LPS incomplet est connu sous le nom de « *rough LPS* » ou LPS rugueux. Les bactéries produisant ce type de LPS, donnent sur milieux solides de culture des colonies de type « *rough* » ou R, à marges irrégulières et ondulantes et à surface rugueuse et plate. En sérum physiologique, ces colonies ne donnent pas de suspension stable et homogène, car les bactéries s'auto-agglutinent. Dans le cas où l'antigène O et le noyau sont absents, le LPS est nommé « *deep rough LPS* » ou LPS rugueux profond. Ces mutants ne peuvent survivre même *in vitro*, que dans de conditions particulières de croissance (Hitchcock *et al.*, 1986).

Il a été démontré qu'en absence du lipide A, la bactérie n'est plus en mesure de garder l'intégrité de la membrane externe et ne peut survivre même *in vitro* (mutants létaux).

2.1. La structure du lipide A

Les premières résultats des recherches

effectuées afin d'élucider la structure de la molécule responsable de l'effet endotoxinique ont été obtenus dans les années '50 par Luderitz et Westphal qui ont soumis les lipopolysaccharides à un traitement acide qui coupe le lien covalent lipide A-noyau. Ils ont ainsi obtenu le premier fragment de LPS qui ne contient plus les chaînes polysaccharidiques de l'antigène O ni du noyau. Ce fragment a été dénommé plus tard le lipide A. Dans les années '60, il a été prouvé que le lipide A est responsable de l'activité endotoxinique de la bactérie. Plus tard, dans les années '80, la première molécule synthétique de lipide A avec un pouvoir toxique a été synthétisée. Cette molécule synthétique de lipide A présentait les mêmes propriétés biologiques que le lipide A d'*E. coli* (Tanamoto *et al.*, 1984 ; Dipadova *et al.*, 1993). Du point de vue structural, le lipide A représente le point d'ancrage du LPS dans la bactérie au niveau de la membrane externe. En fait, il s'insère entre des phospholipides dans la couche externe de la membrane externe de la bactérie.

La structure du lipide A est fortement conservée parmi l'ensemble des bactéries G⁻. Parmi les bactéries d'une même famille, comme la famille *Enterobacteriaceae*, la structure du lipide A est même quasi identique. Chez *E. coli* (figure 2A), le lipide A est composé d'un disaccharide de D-glucosamines liés de façon β -1,6 et phosphorylés en position 1' et 4'. Le disaccharide est acylé en position 2, 3, 2' et 3' avec quatre groupements β -hydroxymyristoyl. Deux autres chaînes d'acides gras : un résidu laurate (12C) et un résidu myristate (14) estérifié à leur extrémité non-réductrice se lient sur deux premiers résidus hydroxymyristoyls (Raetz, 1990).

2.2. La structure du noyau

Le noyau est composé d'hydrates de carbone et de dérivés d'hydrates de carbone. Il est divisé en deux parties distinctes : le noyau interne et le noyau externe (Rick et Silver, 1987 ; Schnaitman et Klena, 1993 ; Raetz, 1994 ; Reeves, 1994). Le noyau interne est lié de façon covalente au lipide A par l'intermédiaire d'un sucre acide : l'acide 3 déoxy-D-manno-

octulosonique (Kdo). Bien que le résidu Kdo ait aussi été observé dans la structure de certains polysaccharides capsulaires, il est considéré comme caractéristique des LPS. Il semblerait aussi que le Kdo joue un rôle dans la viabilité de la bactérie. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le mutant R viable *in vitro* avec le plus court LPS possède un résidu Kdo lié au lipide A (Helander *et al.*, 1988).

La structure générale du noyau interne est fortement conservée chez les bactéries G⁻. Par exemple, les noyaux internes d'*E. coli* et de *Salmonella enterica* ont la même structure (figure 2B). Le noyau interne est composé de deux chaînes principales : la première chaîne composée de deux sucres Kdo et la deuxième chaîne composée par trois heptoses (Hep), souvent avec une configuration L-glycero-D-manno heptose. Dans la structure du noyau interne, les résidus Hep sont souvent modifiés par l'addition de groupes phosphate, pyrophosphate ou diphosphoéthanolamine (Caroff *et al.*, 2002).

Le noyau externe a une structure plus variable que le noyau interne. Il est composé d'hexoses ordinaires, comme le glucose, le galactose ou la N-acétyl-glucosamine. De ce fait, le noyau externe est aussi connu sous le nom de « région hexose ». Jusqu'à présent, seulement cinq structures de noyaux (R1 à R4 et K12) ont été identifiées chez *E. coli* (Joiner *et al.*, 1984 ; Rietschel *et al.*, 1993). Les différences entre ces cinq structures apparaissent surtout dans la région du noyau externe. Parmi ces cinq types, la structure R1 est la plus fréquente sur les souches isolées de prélèvements cliniques (Gibb *et al.*, 1992) et la structure R3 est fréquemment associée aux souches dites vérotoxigènes d'*E. coli* (Currie et Poxton, 1999 ; Amor *et al.*, 2000).

2.3. La structure de l'antigène O

L'antigène O ou antigène somatique (*soma* = corps : antigène somatique = antigène du corps de la bactérie) est le composant spécifique d'un *smooth LPS*. Situé à l'extrémité distale du LPS, l'antigène O représente l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Du point de vue structu-

ral, l'antigène O est le produit d'assemblage par polymérisation de blocs d'hydrates de carbone, nommés aussi « unités O » (figure 2C). Chaque unité O est le produit d'une cascade biosynthétique spécifique (voir chapitre 3.2.). Les unités O sont composées d'un à huit résidus et se répètent jusqu'à 50 fois pour former l'antigène O. Les différentes intensités de polymérisation des unités O entraînent la présence en surface de la bactérie d'une grande variété de longueurs d'antigènes O. Sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, ce polymorphisme de longueur se traduit par un profil d'électrophorèse diffus ou « smear » (figure 3).

L'unité O est un oligosaccharide obtenu par la polymérisation de soit un seul type d'hydrate de carbone (homopolymère), soit plusieurs types différents d'hydrate de carbone (hétéropolymère). D'une souche à l'autre dans la même espèce bactérienne, l'unité O peut montrer des variations dans la structure, les arrangements, et/ou les substitutions latérales des hydrates de carbone. Cela conduit à

une très grande variabilité intraspécifique de l'unité O et, implicitement, de l'antigène O. D'ailleurs, à ce jour, si de nombreuses entités antigéniques O ont été identifiées, bien d'autres n'ont pas été encore caractérisées du point de vue de leur structure moléculaire (Erridge *et al.*, 2002).

La structure de l'antigène O est le facteur déterminant pour la spécificité antigénique du LPS, c'est à dire de la spécificité de sérotype somatique. Le nombre des antigènes O est différent d'une espèce bactérienne à l'autre. Chez l'*E. coli*, plus de 170 sérogroupes O ont été décrits, tandis que, chez *Salmonella enterica*, 46 sérogroupes O ont été décrits (Nikaido, 1994 ; Raetz, 1994). L'identité d'un antigène O est valable seulement dans le cadre d'une même espèce bactérienne. Par exemple, l'antigène somatique du sérotype O1 d'*E. coli* n'a pas la même structure, ni la même spécificité antigénique, que l'antigène somatique du sérotype O1 de *Salmonella enterica* ou de *Vibrio cholerae*. Inversement, il a été observé que des espèces bactériennes éloignées du point de vue phylogénétique peuvent présenter des

structures très similaires d'unité O (Raetz et Whitfield, 2002). C'est le cas des antigènes O de *Brucella sp.* sous-type A, de *Yersinia enterocolitica* O9 et de *Vibrio cholerae* type inaba, qui ont tous les trois une structure quasi identique de l'unité O.

Généralement, une bactérie présente en surface un seul type d'antigène O, mais pour certaines bactéries le complexe lipide A-noyau peut servir comme support pour d'autres polymères polysaccharidiques. Par exemple, chez *E. coli*, la structure lipide A-noyau sert de support d'ancrage non seulement de l'antigène O, mais aussi de l'antigène bactérien commun (« *enterobacterial common antigen* » ou ECA), ou bien encore de l'antigène capsulaire des sérogroupes K1 et K4 (Kuhn *et al.*, 1988 ; Whitfield et Roberts, 1999). Cette propriété du complexe lipide A-noyau, à servir de support pour différents polysaccharides, a aussi été observée chez certaines souches de *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Brucella sp.* (Popoff et Le Minor, 1985 ; Keenleyside *et al.*, 1994 ; Rochetta *et al.*, 1998).

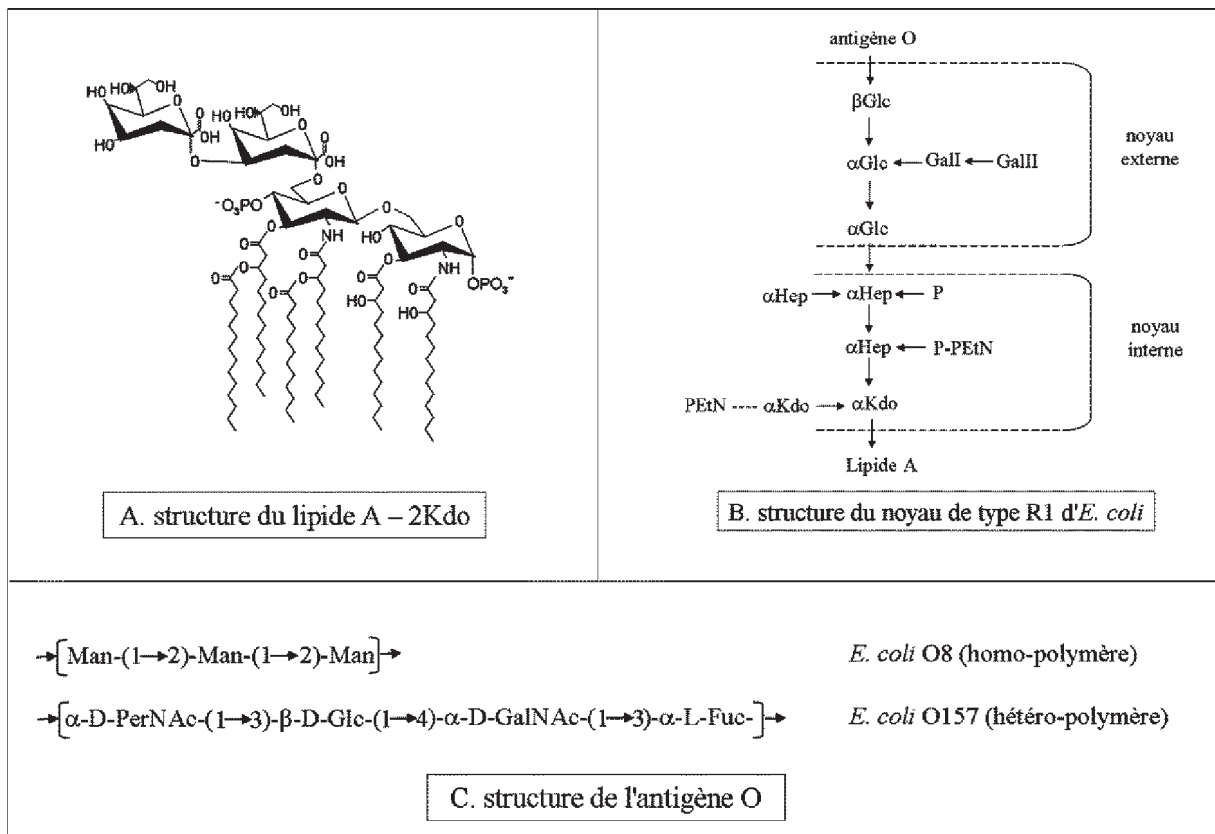


Figure 2 : représentation schématique de la structure des différents composants du lipopolysaccharide (LPS).

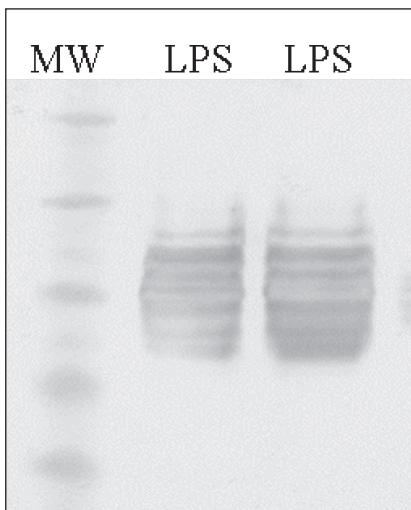


Figure 3 : western blot avec l'anticorps monoclonal 2F3 dirigé contre le lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* O26 entéropathogène (Szalo *et al.*, 2004). Le profil d'électrophorèse du LPS est diffus et forme un « smear »

3. LA BIOSYNTHÈSE DU LIPOPOLYSACCHARIDE

La biosynthèse du LPS est en fait la biosynthèse de deux entités différentes qui seront par après liées l'une à l'autre. La première entité est le complexe lipide A-noyau. Le lipide A est synthétisé à hauteur de la face cytoplasmique de la membrane interne et, par la suite, les hydrates de carbone du noyau lui sont ajoutés de façon séquentielle. Une fois le complexe lipide A-noyau formé, il est transféré à la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. La deuxième entité est l'antigène O. Celui-ci, une fois synthétisé, sera greffé, dans l'espace périplasmique, à l'extrémité distale du noyau externe du complexe lipide A-noyau pour former une structure LPS complète.

3.1. La biosynthèse du complexe lipide A-noyau

3.1.1 Le lipide A

La biosynthèse de cette première partie du LPS est un processus séquentiel dans lequel chaque enzyme catalyse la formation du substrat pour l'enzyme suivante. Une partie des gènes responsables de cette étape sont organisés dans un petit opéron *lpxDAB* (situé ~ 4 minutes sur le chromosome d'*E. coli*). Les autres gènes intervenant dans la biosynthèse du lipide A sont localisés

en dehors de cet opéron sans que leurs positions respectives sur le chromosome ne reflètent la succession des réactions enzymatiques (Schnaitman et Klena, 1993 ; Heinrichs *et al.*, 1998 ; Raetz et Whitfield, 2002).

La synthèse du lipide A commence à partir d'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) (figure 4). La biosynthèse de ce précurseur est elle-même catalysée par une enzyme bifonctionnelle, codée par le gène *glmU*. Cette enzyme est d'autant plus importante qu'elle initie non seulement la synthèse du lipide A, mais aussi la biosynthèse du peptidoglycan, de l'antigène bactérien commun ECA et de certains antigènes O ayant dans leur structure le sucre N-acétylglucosamine (Raetz, 1994).

Dans une première étape, sous l'action de l'enzyme UDP-GlcNAc acyltransférase (LpxA) codée par le gène *lpxA*, l'UDP-GlcNAc est acylé sur son carbone C3 à partir de l'acide gras β -hydroxymyristate (14C) (figure 4). L'acide gras β -hydroxymyristate est porté sur une protéine porteuse, l'« acyl carrier protein » (ACP) (Anderson et Raetz, 1987 ; Anderson *et al.*, 1993). Cette étape est suivie par une déacétylation en C2 catalysée par un métallo-enzyme, LpxC, liant le Zn^{++} . Contrairement aux autres gènes dont les produits interviennent dans la biosynthèse du lipide A et qui ont des copies homologues situées ailleurs sur les génomes bactériens, le gène *lpxC* (situé ~ 2,3 minutes sur le chromosome d'*E. coli*) codant pour cette métallo-enzyme, est présent en une seule copie sur les génomes de nombreuses bactéries G⁻ (Anderson *et al.*, 1988 ; Young *et al.*, 1995 ; Sorensen *et al.*, 1996 ; Jackman *et al.*, 2001). Une deuxième acylation en C2, à partir d'une deuxième molécule de β -hydroxymyristate, va aboutir à la formation d'UDP-2,3-diacylglucosamine, précurseur de la partie terminale non réductrice du lipide A. Cette deuxième acylation est sous le contrôle de l'acyltransférase LpxD qui, bien qu'ayant une fonction similaire, ne montre pas d'homologie élevée avec l'enzyme LpxA (Kelly *et al.*, 1993). Ensuite, l'UDP-2,3-diacylglucosamine perd son résidu phosphate sous l'action de la pyrophosphatase (LpxH)

pour former le 2,3-diacylglucosamine-1-phosphate, appelé aussi « lipide X » (Raetz et Whitfield, 2002). Sous l'action d'une disaccharide synthase (LpxB), le lipide X va se lier avec l'UDP-2,3-diacylglucosamine (lien β -1,6) pour former le disaccharide de glucosamine (Bulawa et Raetz, 1984 ; Ray *et al.*, 1984).

Une kinase (LpxK) va encore phosphoryler la position 4' du disaccharide pour former le lipide IV_A, une structure qui possède déjà certaines propriétés endotoxiques spécifiques du lipide A natif (Ray et Raetz, 1987). Avant l'étape finale de la synthèse du lipide A, deux résidus Kdo (acide 3 déoxy-D-manno-octulosanique) sont ajoutés au lipide IV_A sous l'action d'une enzyme bifonctionnelle codée par le gène *waaA* (ou *kdtA*) (~ 82 minutes chez *E. coli*). Le transfert de ces deux résidus Kdo se fait à partir de CMP-Kdo sur le carbone 6' du lipide IV_A (Clementz et Raetz, 1991).

Les étapes finales de la synthèse du lipide A sont l'addition d'un résidu lauréate et d'un résidu myristate sous le contrôle des lauroyl- et miristoyl-transférases codées par les gènes *lpxL* (ou *htrB*) (situé ~ 24 minutes sur le chromosome d'*E. coli*) et *lpxM* (ou *msbB*) (situé ~ 41,7 minutes sur le chromosome d'*E. coli*). Chez *E. coli*, il existe un gène *lpxP* activé à des températures en-dessous de 12°C, qui va insérer un résidu palmitoléate à la place du résidu lauréate. Cette particularité peut être interprétée comme une réponse de la bactérie qui doit ajuster la fluidité de la membrane externe à des températures basses (Carty *et al.*, 1999). Les deux acylations finales sont conditionnées par présence des résidus Kdo sur le lipide IV_A.

3.1.2. Le complexe lipide A-noyau

Le lipide A-Kdo₂ nouvellement synthétisé va servir de support sur lequel les oligosaccharides du noyau seront assemblés. Les gènes qui contrôlent la synthèse du noyau ont été cartographiés dans le locus *waa* (ou *rfa*) (situé ~ 82 minutes sur le chromosome d'*E. coli*) situé sur le chromosome entre les gènes *cysE* et *pyrE*. Le locus *waa* contient trois opérons nommés d'après le premier gène du transcriptome : *gmhD*, *waaQ* et *waaH*.

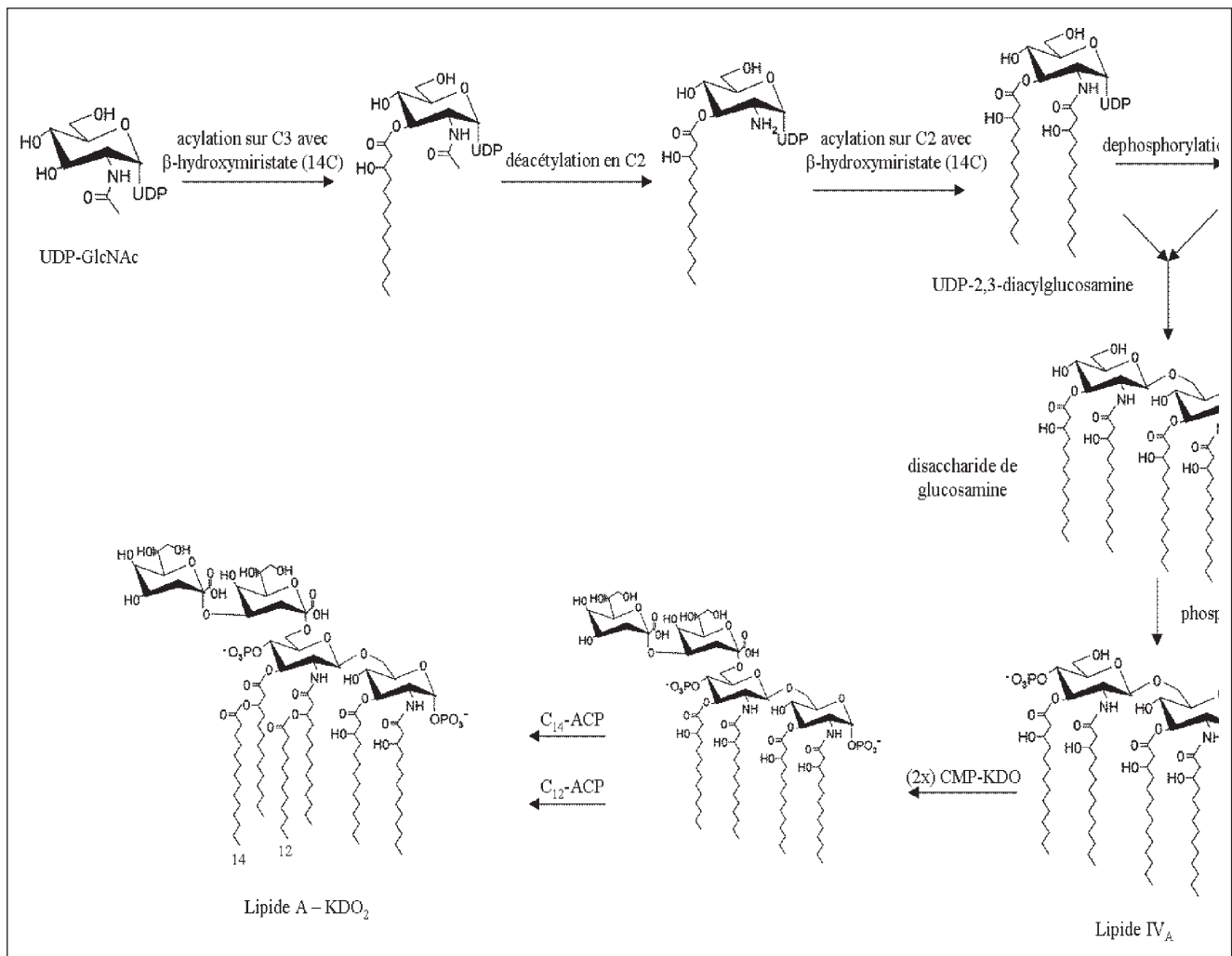


Figure 4 : la biosynthèse du lipide A.

L'opéron *gmhD-waaFCL* est nécessaire pour la biosynthèse du noyau interne. L'opéron *waaQ* (*waaQGPO-TYWVL*) contient les gènes intervenant dans la biosynthèse du noyau externe et dans l'assemblage de ses résidus latéraux. L'opéron *waaA* contient le gène *waaA* (*kdtA*) codant pour la transférase Kdo et le gène *coaD* (*kdtB*) qui, paradoxalement, ne joue aucun rôle dans la synthèse du LPS. Il code pour une phosphopantéthéine adénylyl-transférase, qui catalyse la formation du déphospho-coenzyme A.

Dans l'opéron *gmhD-waaFCL*, le gène *waaL* code pour une ligase (WaaL) responsable du rattachement des structures polysaccharidiques (par exemple l'antigène O) au complexe lipide A-noyau, tandis que les gènes *gmhD*, *waaF* et *waaC* contrôlent le transfert des deux molécules d'heptose (L-glycero-D-manno-heptose ou L-D-Hep) sur le complexe lipide A-

Kdo₂, afin de former le noyau interne sur lequel sera fixé le noyau externe (Heinrichs *et al.*, 1998). L'addition de ces deux heptoses, nécessaires pour former le noyau interne, se fait à partir du sucre actif l'adénosine diphosphate heptose (ADP-Hep). L'ADP-Hep est synthétisé dans une cascade de réactions enzymatiques, qui ont été proposées en étroite corrélation avec les transférases intervenant dans la transformation de son précurseur, le séduloheptulose-7-P (figure 5) (Kneidinger *et al.*, 2002). Ainsi, la première étape est la conversion du séduloheptulose-7-P, sous l'action d'une isomérase (codée par le gène *gmhA*), en D-glycero-D-manno-heptose-7-P. À partir de celui-ci le D-glycero-D-manno-heptose-1-P sera obtenu, qui, sous l'action de l'ADP-heptose synthase (codée par le gène *hldE*), va donner l'ADP-D-glycero-D-manno-heptose. L'étape finale est une épimérisation (sous le contrôle du gène *hldD*) en ADP-L-glycero-D-

manno-heptose. Sous l'action d'heptosyltransférases (codées par les gènes *waaF* et *waaC*) les résidus L-D-Hep sont ajoutés sur le complexe lipide A-Kdo₂. Le premier heptose (HepI) est lié α 1,5 au Kdo I et le deuxième heptose (HepII) s'ajoute en suite en α 1,3 sur le HepI (Kneidinger *et al.*, 2002).

Les variations dans la composition des hydrates de carbone du noyau externe font que la façon dont sa biosynthèse se déroule est différente selon la souche bactérienne. Dans le modèle d'*E. coli* à noyau de type R1, les gènes nécessaires pour la synthèse du noyau externe sont situés dans l'opéron *waa-QGPOTYWVL*. Dans ce modèle, le noyau externe se compose de trois hexoses principaux additionnés de façon séquentielle. Les chaînes latérales sont ajoutées pendant la synthèse du tronc principal. Ainsi le premier HexI, qui est une molécule de glucose (GlcI), est transféré à partir d'uridine

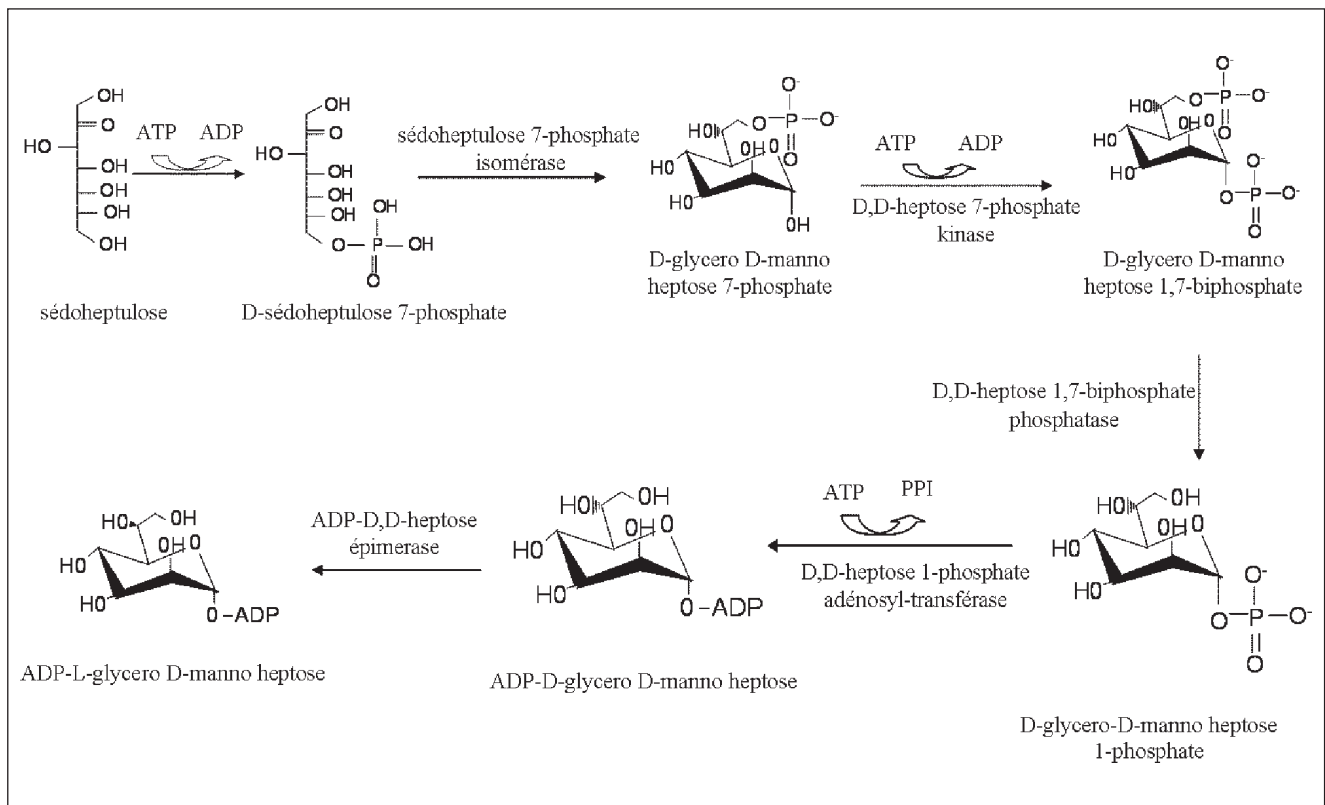


Figure 5 : la biosynthèse du résidu L-D-Hep utilisé pour la synthèse du noyau.

diphosphate glucose (UDP-Glc), sous le contrôle du gène *waaG*, pour former un lien en α 1,3 avec le HepII du noyau interne. Le deuxième hexose (HexII), qui est aussi une molécule de glucose (GlcII), est transféré en α 1,3 sur le GlcI, sous le contrôle du gène *waaO*. Le premier substituant, qui est une molécule de galactose (GalI), est lié sur le GlcII à partir d'uridine diphosphate galactose (UDP-Gal) sous le contrôle du gène *waaT*. Un deuxième substituant, qui est une autre molécule de galactose (GalII), est lié sur le GlcI à partir d'uridine diphosphate galactose (UDP-Gal) sous le contrôle du gène *waaW*. Le troisième résidu hexose (HexIII), une molécule de glucose (GlcIII), est lié en α 1,2 sur le GlcII sous le contrôle du gène *waaV* (Raetz et Whitfield, 2002).

Le gène *waaL* de l'opéron *waaQG-POTYWVL* est une copie du gène *waaL* présente dans l'opéron *gmhD-waaFCL*, tandis que les gènes *waaP*, *waaQ* et *waaY* codent pour les enzymes WaaP, WaaQ et respectivement WaaY, qui sont nécessaires pour les modifications latérales du noyau interne.

Le gène *waaA* (*kdtA*) est responsable du transfert de deux résidus Kdo sur le

lipide IV_A, avant de l'étape finale de la synthèse du lipide A.

3.2. La biosynthèse de l'antigène O

Comme pour les autres composants du LPS, la biosynthèse de l'antigène O est un processus séquentiel. Cette biosynthèse représente une tâche complexe pour la cellule bactérienne, car elle doit assurer une fidélité de structure et de conformation des chaînes polysaccharidiques, ainsi qu'une organisation membranaire adéquate permettant la synthèse et l'assemblage du LPS complet (Whitfield, 1995). Malgré l'énorme variabilité intra-espèce des chaînes O, la synthèse de l'antigène O peut être décrite comme un processus en quatre étapes : i) la synthèse des différents hydrates de carbone primaires spécifiques de l'unité O ; ii) la formation de l'unité O à partir des hydrates de carbone primaires ; iii) la polymérisation des unités O pour former la chaîne polysaccharidique O ; et iv) le transfert dans le périplasme de l'antigène O sur le complexe lipide A-noyau.

La majorité des enzymes intervenant dans les différentes étapes de la biosyn-

thèse de l'antigène O sont codés par des gènes regroupés en général sur le chromosome dans le locus *rfb* (situé ~ 45 minutes sur le chromosome d'*E. coli*) (figure 6), formant un seul opéron (Popoff et Le Minor, 1985 ; Reeves *et al.*, 1996). L'opéron *rfb* est situé sur le chromosome entre les gènes *galF* et *gnd* sur une longueur d'environ 10 kb (Wang et Reeves, 1998). En amont, l'opéron *rfb* est précédé par une séquence JUMPStart (« *Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Start* ») de 39 pb qui a été identifiée aussi dans la région régulatrice d'autres opérons intervenant dans des synthèses polysaccharidiques comme l'opéron *waaQ* (synthèse du noyau externe du LPS) et l'opéron *kps* (synthèse de la capsule de group II d'*E. coli*) (Hobbs et Reeves, 1994). La séquence JUMPStart contient la région *ops* (« *operon polarity suppressor* ») qui permet la transcription ininterrompue de longs fragments d'ADN (Bailey *et al.*, 1997).

Les gènes composant l'opéron *rfb* peuvent être groupés en fonction de l'étape dans laquelle ils interviennent dans la biosynthèse du LPS. Ainsi, le

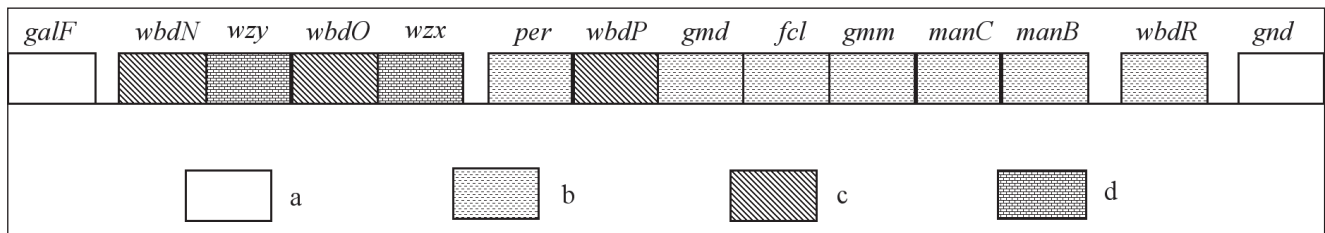


Figure 6 : représentation schématique de la structure de l'opéron *rfb* codant pour l'antigène O d'*E. coli* de sérotype O157.

a – gènes entourant l'opéron codant pour l'antigène O et n'intervenant pas dans sa synthèse.

b – gènes intervenant dans la formation de précurseurs d'hydrates de carbone primaires (sans spécificité de sérotype)

c – gènes intervenant dans la synthèse des transférases responsables de l'assemblage des composants de l'unité O (avec une faible spécificité de sérotype)

d – gènes responsables de l'assemblage des unités O en chaîne polysaccharidique (avec une forte spécificité de sérotype)

premier groupe est composé par les gènes intervenant dans la formation de précurseurs d'hydrates de carbone primaires (dTDP-rhamnose, GDP-N-acétylpérosamine, etc.). Le deuxième groupe est constitué des gènes intervenant dans la synthèse des transférases responsables de l'assemblage des composants de l'unité O. Le troisième groupe est constitué des gènes responsables de l'assemblage des unités O en chaîne polysaccharidique et du rattachement de l'antigène O, au complexe lipide A-noyau, pour former le LPS final. Ainsi, pour *E. coli* O157 (figure 6) le premier groupe est composé par les gènes *per*, *gmd*, *fcl*, *gmm*, *manC*, *manB* et *wbdR* ; le deuxième groupe par les gènes *wbdN*, *wbdO* et *wbdP* ; et le troisième groupe par les gènes *wzx* et *wzy*. Les gènes du premier groupe, intervenant dans la formation de précurseurs d'hydrates de carbone primaires, ont une faible spécificité de sérotype et ils sont communs à plusieurs sérotypes somatiques étant donné que sucre donné peut être retrouvé comme partie constituante de l'unité O de plusieurs sérotypes différents. Les gènes du deuxième groupe présentent une faible spécificité de sérotype somatique, étant donné que leurs produits de synthèse catalysent et contrôlent des liaisons spécifiques entre des hydrates de carbone spécifiques afin d'obtenir l'unité O spécifique pour chaque sérotype. Les gènes du troisième groupe présentent, par contre, une spécificité élevée de sérotype somatique, car ils sont spécifiques des unités O. Ils sont responsables de la polymérisation des unités O, du transfert de l'antigène O sur le complexe lipide A-noyau, de l'assemblage final du LPS et de

l'organisation tridimensionnelle de l'antigène O en surface de la bactérie (Wang et Reeves, 1998).

3.2.1. Synthèse intracytoplasmique

Le début de la synthèse de l'unité O se fait sur un support représenté par un lipide porteur (figures 7 Aa et Bd), l'undécaprénylphosphate (und-P, nommé aussi ACL ou « *antigen carrier lipid* »). L'und-P, qui est un dérivé de l'alcool isoprénoïde (C55), est aussi utilisé dans la biosynthèse des peptidoglycans et des polysaccharides capsulaires, et est attaché à la face interne de la membrane cytoplasmique. Comme le lipide porteur sur lequel se fait la synthèse des unités O est attaché à la face interne de la membrane cytoplasmique, la synthèse des unités O se fait dans le cytoplasme au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique.

La première étape de la synthèse des unités O est le transfert d'un résidu hydrate de carbone-1-P sur l'und-P (figures 7 Aa et Bd). L'énergie de ce premier hydrate de carbone-1-P est conservée jusqu'à la fin, pour servir comme source d'énergie au moment de la liaison de la chaîne polysaccharidique sur le complexe lipide A-noyau. Cette première étape dans la synthèse des unités O est, chez *E. coli*, sous le contrôle du gène *wecA*, un gène présent chez plusieurs entérobactéries et situé en dehors de l'opéron *rfb*. Ce gène code pour la transférase WecA (Rfe) qui, par l'addition d'UDP-GlcNAc sur l'und-1-P, initie la synthèse des unités O (Meier-Dieter *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 1996). Par la suite, les autres hydrates de carbone composant l'unité O sont ajoutés, l'un après l'autre, pour former le complexe und-PP-unité O. Cette étape de la syn-

thèse des unités O est sous le contrôle des gènes appartenant aux premier et deuxième groupes de gènes de l'opéron *rfb*. Le type, le nombre et l'ordre des hydrates de carbone ajoutés sont spécifiques pour l'unité O à synthétiser.

3.2.2. Le transfert vers la périplasmie

Les unités O sont les parties composantes des polysaccharides O qui, au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique dans l'espace périplasmique, vont se lier sur le complexe lipide A-noyau (McGrath et Osborn, 1991). En conséquence, le processus d'assemblage du complexe lipide A-noyau-polysaccharide O doit comprendre un mécanisme d'exportation des unités O de la face interne de la membrane cytoplasmique vers la périplasmie.

En fonction de ce mécanisme d'exportation vers la périplasmie, c'est-à-dire en fonction de la cascade enzymatique suivie, les bactéries appartiennent à trois groupes : i) mécanisme dit « dépendant de Wzy » (figure 7A) ; ii) mécanisme dit « dépendant d'un complexe de transport ABC » (figure 7B) ; iii) mécanisme dit « dépendant des synthases » (Raetz et Whitfield, 2002).

3.2.2.1. Le mécanisme dit « dépendant de Wzy »

Ce mécanisme a été observé pour la première fois chez *Salmonella* Typhimurium et ensuite chez *E. coli* et chez d'autres bactéries. Ce mécanisme est caractéristique des bactéries dont l'unité O est un hétéropolymère, avec ou sans chaînes latérales.

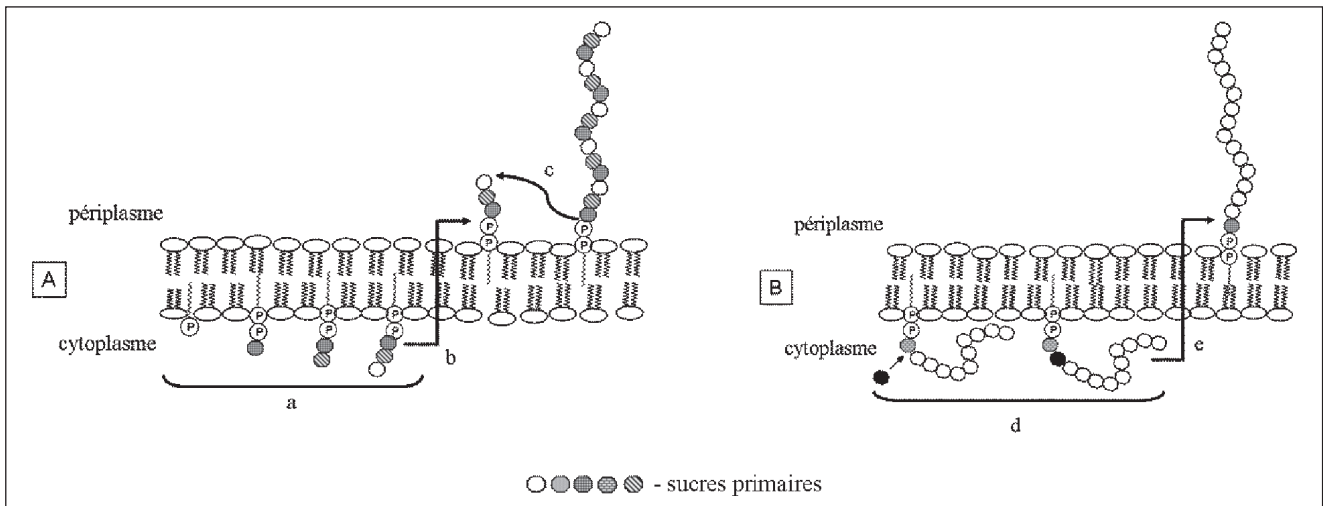


Figure 7 : représentation schématique de la biosynthèse de l'antigène O.

A – le mécanisme dit « dépendant de Wzy » : la synthèse des unités O se fait à la face cytoplasmique de la membrane cytoplasmique et la polymérisation de la chaîne polysaccharidique se fait à la face périplasmique de la membrane cytoplasmique

a – la synthèse de l'unité O : les hydrates de carbone sont ajoutés l'un après l'autre sur l'undécaprénylphosphate (l'und-P)

b – le complexe und-PP-unité O est transféré dans le périplasma sur la face externe de la membrane cytoplasmique sous le contrôle de *wzx*

c – la polymérisation de la chaîne polysaccharidique ; sous le contrôle du gène *wzy* la chaîne polysaccharidique en formation va se détacher de son lipide porteur l'und-P pour se lier sur un nouveau complexe und-PP-unité O à l'extrémité non réductrice de l'unité O

B – le mécanisme dépendant de transporteurs ABC : la polymérisation de la chaîne polysaccharidique se fait à la face cytoplasmique de la membrane cytoplasmique

d – l'élongation de la chaîne polysaccharidique se fait par l'addition d'un nouvel hydrate de carbone à l'extrémité réductrice de la chaîne polysaccharidique en formation.

e – la chaîne polysaccharidique nouvellement synthétisée est transportée sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique via un complexe de transport ABC.

Après la synthèse de l'unité O, chaque complexe und-PP-unité O est transporté à la face périplasmique de la membrane cytoplasmique sous le contrôle de la protéine Wzx, appelée aussi la « flippase » (figure 7Ab). Cette protéine est codée par le gène *wzx*, un gène situé sur l'opéron *rfb*. Des études ont, en effet, montré que les bactéries mutées dans le gène *wzx* accumulent les complexes und-PP-unité O à la face cytoplasmique de la membrane interne (Liu *et al.*, 1996). Des études ultérieures ont démontré que la protéine Wzx ou « flippase » agit indépendamment de la structure de l'hétéropolymère constituant l'unité O, ainsi que de l'hydrate de carbone initiant la synthèse de l'unité O.

Une fois dans l'espace périplasmique, à la face périplasmique de la membrane cytoplasmique, les unités O des complexes und-PP-unité O seront utilisées dans une réaction de polymérisation pour former la chaîne polysaccharidique de l'antigène O. Cette réaction de polymérisation est sous le contrôle de la polymérase Wzy, codée par le gène *wzy*. Le gène *wzy* est situé dans l'opéron *rfb* et il présente une forte

spécificité de séro-groupe.

Le mécanisme selon lequel la polymérisation de la chaîne polysaccharidique s'effectue, est le suivant : une fois à la face externe de la membrane cytoplasmique, l'unité O d'un complexe und-PP-unité O va se détacher de son lipide porteur, l'und-P, et va se lier sur un autre complexe und-PP-unité O (figure 7Ac). Cette liaison se fait sur l'unité O, plus précisément à son extrémité non réductrice, pour former le complexe und-PP-(unité O)₂. Par la suite, le dimère (unité O)₂ du complexe und-PP-(unité O)₂ va se détacher de son lipide porteur l'und-P pour se lier sur un autre complexe und-PP-unité O, toujours à l'extrémité non réductrice de l'unité O, pour former le complexe und-PP-(unité O)₃. En résumé, la polymérisation de la chaîne polysaccharidique dans le mécanisme « dépendant de Wzy » implique le détachement de la chaîne polysaccharidique en cours de polymérisation, (unité O)_n de son lipide porteur et son attachement à l'extrémité non réductrice de l'unité O d'un nouveau complexe und-PP-unité O pour former le complexe und-PP-(unité O)_{n+1}. Ainsi

dans chaque étape le polymère en formation s'allonge d'une unité (Bray et Robbins, 1967 ; Robbins *et al.*, 1967). La protéine Wzy est spécifique de l'unité O composant la chaîne polysaccharidique. Les bactéries mutées dans le gène *wzy*, ne peuvent plus polymériser les unités l'une sur l'autre et, en conséquence, produisent en surface un LPS contenant une seule unité O (Collins et Hackett, 1991).

La longueur de la chaîne O est contrôlée par la protéine Wzz (Rol) (Batchelor *et al.*, 1991). Cette protéine est codée par le gène *wzz*, un gène qui est situé en aval de l'opéron *rfb* et qui présente une forte spécificité de séro-groupe. Son mécanisme hypothétique d'action est de moduler l'activité des protéines Wzy et WaaL (responsable de la liaison de la chaîne polysaccharidique au complexe lipide A-noyau) en favorisant, soit l'élongation, soit la liaison de la chaîne polysaccharidique (Bastin *et al.*, 1993).

3.2.2.2. Le mécanisme dépendant de transporteurs ABC

Nommé aussi « mécanisme monomérique » il est typique des bactéries dont

l'antigène O est un homopolymère sans résidu latéral. Ce type de mécanisme a été décrit chez *E. coli* O4, O7, O8, O9, O18, mais aussi chez d'autres espèces, comme *Klebsiella pneumoniae* ou *Salmonella enterica*. Dans ce cas, l'élongation de la chaîne O a lieu dans le cytoplasme à la face interne de la membrane cytoplasmique par l'addition d'un résidu glycosyl à l'extrémité non réductrice du complexe und-PP-chaîne polysaccharidique (figure 7Bd). Les hydrates de carbone caractéristiques pour l'unité O sont ajoutés de façon séquentielle à l'extrémité non réductrice du chaîne polysaccharidique en formation, l'und-PP-GlcNAc-(hydrate de carbone)_n pour former le complexe und-PP-GlcNAc-(hydrate de carbone)_{n+1}. En fait, la synthèse est initiée sous l'action d'un homologue de la protéine WecA et, une fois le complexe und-PP-GlcNAc formé, il va agir comme amorce pour l'élongation de la chaîne polysaccharidique. Dans ce cas, la biosynthèse d'une chaîne polysaccharidique nécessite un seul und-PP et la présence d'une polymérase spécifique n'est pas nécessaire. Une fois le polymère synthétisé, il sera transporté via un complexe de transport ABC sur la face périplasmique de la membrane interne (figure 7Be). Le mécanisme exact de passage n'est pas totalement élucidé. Ce complexe fait partie d'une grande famille des « *ABC transporters* » et plus précisément de la sous-famille des exportateurs ABC-2. Ce système de synthèse n'implique pas la présence d'un régulateur de la longueur de la chaîne polysaccharidique comme Wzz. Malgré cela, les bactéries utilisant ce mécanisme de synthèse présentent une distribution modale du LPS en surface de la bactérie, dans laquelle la longueur de la chaîne polysaccharidique n'est pas aléatoire, mais bien contrôlée (Whitfield *et al.*, 1997).

3.2.2.3. Le mécanisme de synthèse dépendant de synthèses

Les synthèses sont des glycosyl-transférases membranaires, ayant la capacité de synthétiser des polymères. Le seul exemple de mécanisme de synthèse du LPS dépendant des synthèses connu à ce jour est celui de l'antigène O54 de *S. enterica*

sérovar Borreze (Keenleyside *et al.*, 1994 ; Keenleyside et Whitfield, 1995 ; Keenleyside et Whitfield, 1996). L'hypothèse actuelle est que le transfert transmembranaire de la chaîne polysaccharidique se fait au fur et à mesure de sa synthèse (Keenleyside et Whitfield, 1996 ; Rocchetta et Lam, 1997), mais le mécanisme exact de transfert, ainsi que celui déterminant la longueur du polymère n'ont pas encore été élucidés.

3.2.3. La liaison de l'antigène O sur le complexe lipide A-noyau

La liaison de l'antigène O sur le complexe lipide A-noyau se fait dans le périplasma et nécessite la présence du gène *waal* intact (Klena *et al.*, 1993). La mutation du gène *waal* a, en effet, comme résultat la production d'un LPS composé du complexe lipide A-noyau, mais sans l'antigène O, bien que l'antigène O soit synthétisé et s'accumule dans le périplasma. Le mécanisme exact de la liaison n'est pas encore élucidé.

3.3. Le transfert du LPS en surface de la bactérie

La translocation du LPS complet au travers de la membrane externe reste un chapitre ouvert dans la biosynthèse du LPS. Il a été observé qu'il n'y a pas de différence concernant l'efficacité de la translocation en fonction de la structure ou du type de LPS (Osborn *et al.*, 1980). L'hypothèse acceptée, mais pas encore démontrée expérimentalement, est que le LPS se trouve dans sa forme finale sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. De là, il est transféré sur la face périplasmique de la membrane externe au travers du réseau du peptidoglycan, d'où il sera exporté en surface de la bactérie (Schnaitman et Klena, 1993). Concernant le transfert sur la face périplasmique de la membrane externe, il existe plus de suppositions que de certitudes. Certaines d'entre elles évoquent le transfert via les ponts Bayer, qui jouent un rôle important dans l'assemblage des constituants de la membrane externe (Nikaido et Vaara, 1987). D'autres hypothèses évoquent le transfert du LPS en profitant des systèmes de sécrétion de protéines, comme le sys-

tème de sécrétion de type III, qui réalisent un pont de liaison entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Sandkvist, 2001).

4. LPS ET PATHOGÉNIE BACTÉRIENNE

Etant un composant de base de la membrane externe des bactéries G⁻, le LPS joue aussi dans la relation hôte-bactérie, avec des implications éventuelles dans la pathogenèse des infections bactériennes. Ce rôle du LPS dans la pathogénie est dû essentiellement à deux de ses composants : le lipide A et l'antigène O.

4.1. Rôle du lipide A

Le lipide A, nommé aussi l'endotoxine, est la partie responsable de l'induction de la réponse immunitaire non spécifique ayant comme fin le choc endotoxinique. Inoculé sous sa forme purifiée chez les animaux de laboratoire, il induit le même effet que le LPS complet purifié.

Le lipide A, qui est toxique à partir de quantités de quelques picomoles, se fixe sur une protéine fixatrice du LPS, la LBP (« *LPS binding protein* »). Le complexe lipide A-LBP se fixe ensuite aux macrophages sur des récepteurs spécifiques (Wright *et al.*, 1990). À ce jour, en surface des macrophages, deux groupes de récepteurs spécifiques pour le complexe lipide A-LBP ont été identifiés : i) le récepteur CD14 ; et ii) le récepteur TLR-4 (« *Toll-Like Receptor 4* ») (Fujihara *et al.*, 2003).

Le récepteur CD14 est localisé en surface des macrophages, mais il existe aussi sous une forme soluble en circulation (sCD14). Dans les cellules qui n'ont pas en surface des récepteurs CD14, comme par exemple les cellules épithéliales, la réponse au LPS peut se faire par l'intermédiaire du sCD14. La concentration nécessaire du lipide A pour activer les macrophages est réduite de 100 à 1000 fois, si le complexe CD14-lipide A est formé (Fujihara *et al.*, 2003). Cependant, le récepteur CD14 ne possédant pas de domaines transmembranaires ou intracellulaires, il ne peut pas être considéré, à lui seul, comme l'initiateur de l'activation de la réponse immunitaire.

Les récepteurs TLR représentent une famille de protéines jouant un rôle essentiel dans la reconnaissance de structures pathogènes. Chez les mammifères, cette famille est composée de dix membres. Par rapport au récepteur CD14, les récepteurs TLR possèdent des domaines transmembranaires et intracellulaires. Chacun des membres de la famille a une spécificité pour une certaine structure pathogène. Le récepteur TLR-4 a été identifié comme étant le récepteur spécifique pour le LPS (Poltorak *et al.*, 1998 ; O'Neill *et al.*, 2003).

D'autres structures comme l'intégrine CD11/CD18 (Perera *et al.*, 2001), un complexe de quatre protéines (Triantafilou *et al.*, 2002), les protéines intracellulaires NOD1 et NOD2 (Inohara *et al.*, 2002) et la protéine BPI (« *Bactericidal/permeability increasing protein* ») (Beamer *et al.*, 1999), ont été mentionnées comme fixateurs spécifiques du LPS et interviennent dans l'activation du système immunitaire.

Une fois le lipide A fixé sur les macrophages, ces derniers vont sécréter des cytokines proinflammatoires comme l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8), le TNF α (« *Tumour necrosis factor-alpha* »), le PAF (« *platelet-activating factor* »). À hauteur de leurs cellules cibles respectives, ces différentes cytokines vont activer, après fixation sur des récepteurs spécifiques, la production des médiateurs de l'inflammation, comme les prostaglandines et les leukotriènes. Les cascades du complément et de la coagulation (via l'activation du facteur XII) sont également initiées. Sur le plan physiopathologique les différents intermédiaires provoquent l'apparition de la fièvre et d'hypotension généralisée suite à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, à l'effet dépressur sur la contraction cardiaque et à la vasodilatation. Des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD), de l'hyperglycémie et de la diarrhée sont aussi observées. Dans le cas d'infections sévères avec des bactéries G⁻, une production en excès de ces différents médiateurs, comme conséquence d'une libération en grande quantité de LPS/lipide A suite à la mort et à la

lyse des bactéries, ainsi qu'une hyperactivation du système du complément, peuvent produire des dommages irréversibles dans différents organes avec l'apparition de décompensations multiples et de choc endotoxique, menant au coma et à la mort (Hamann *et al.*, 1998 ; Cohen, 2002).

Les différentes espèces animales n'ont pas la même sensibilité envers le lipide A et son effet endotoxinique. Ainsi, les espèces les plus sensibles aux effets de l'endotoxine sont l'homme, le cheval, le porc, le bovin, le mouton, la chèvre et le chat. Le chien et le lapin sont relativement résistants.

4.2. Rôle de l'antigène O

Représentant la partie immunogénique spécifique du LPS, l'antigène O influence la relation hôte-bactérie à différents niveaux en assurant différentes fonctions comme la résistance à l'action du complément, la résistance à la phagocytose, le mimétisme moléculaire et l'adhérence aux tissus de l'hôte.

4.2.1. La résistance à l'action du complément

Le complexe du complément, ainsi que les anticorps, reconnaissent et se fixent sur l'antigène O. Le complément représente un ensemble de protéines sériques (C1 à C9) qui, suite à leur activation, vont attirer les phagocytes, opsoniser les bactéries et former un complexe d'attaque membranaire (« *Membrane Attack Complex* » ou MAC) qui s'insère dans la membrane externe des bactéries G⁻. La perturbation engendrée s'étend à la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne leur mort et leur lyse, dans certaines conditions (Salyers et Whitt, 1994 ; 2002). L'activation du complément peut se faire par deux voies (classique et alternative), et, dans les deux cas, par une cascade de réactions.

Dans la voie dite classique, l'activation du complément est enclenchée par la liaison d'anticorps spécifiques à l'antigène O, suivie de la fixation et de l'activation de C1. Sous l'action de C1 activé, le C2 et le C4 vont former la C3 convertase. Celle-ci va scinder le C3 en deux fractions : le C3a et le C3b. Le C3a intervient dans l'activation de phagocytes tandis que le

C3b va se coupler avec Bb, qui est le produit de clivage d'une protéine sérique, pour former le complexe C3bBb. Celui-ci va se coupler avec une deuxième molécule C3b pour former la C5 convertase. La C5 convertase clive le produit C5 en C5a, qui attire les phagocytes, et en C5b, qui se fixe à une chaîne latérale de l'antigène O du LPS des bactéries Gram négatives puis lie C6, C7 et C8. Ce complexe se fixe dans la membrane externe des bactéries et, finalement lie plusieurs copies de C9 pour former le MAC. Le MAC forme un pore dans la membrane externe, qui s'étend à la membrane cytoplasmique en provoquant la mort de la bactérie.

Dans la voie dite « alternative », l'activation du complément est enclenchée par des molécules présentes à la surface des bactéries, telles le LPS des bactéries G⁻ et les acides teichoïques des bactéries G⁺, qui fixent le C3b, qui provient du clivage naturel à bas niveau dans le sérum du C3. Suite à cette liaison, le C3b est activé et peut former un complexe avec Bb formant la C3 convertase, qui entretient de manière autocatalytique le clivage de C3 en C3a et C3b. À partir de ce point, la cascade des réactions dans l'activation du complément par la voie alternative est identique avec celle de la voie classique.

Les mécanismes moléculaires de la résistance des bactéries à l'action bactéricide du complément ne sont pas encore connus avec certitude, mais il est fort probable que cette résistance a ses origines dans la conformation tridimensionnelle du LPS, et en particulier de l'antigène O, en surface de la bactérie. En effet, s'il est vrai que le LPS peut activer la voie alternative de la cascade du complément, il apparaît aussi que certains antigènes O particulièrement ramifiés aident la bactérie à échapper à l'action bactéricide du complément. Cette conformation ramifiée pourrait bloquer la cascade du complément, en prévenant le dépôt de facteur C3b, ou pourrait bloquer le dépôt stable du complexe C5b-C8 dans la membrane bactérienne avant la fixation du composant C9 (Whitfield *et al.*, 1994 ; Hull, 1997 ; Salyers et Whitt, 2002). De ce fait, la lyse bactérienne sous l'action du complément

est empêchée ou au moins diminuée. Cette résistance à l'action lytique du complément est influencée par la longueur de l'antigène O, ses ramifications et aussi par sa composition biochimique.

4.2.2. La résistance à la phagocytose

La propriété de phagocytose est en fait répandue dans l'ensemble du monde cellulaire. Cependant, parmi toutes les cellules capables de phagocyter des bactéries, seuls les phagocytes dits « professionnels » (polynucléaires neutrophiles et macrophages) sont, en principe, capables de tuer les bactéries phagocytées (Salyers et Whitt, 1994). La réponse cellulaire initiale de l'organisme face à une invasion bactérienne commence par la migration dirigée de phagocytes neutrophiles et macrophages d'origines locale et sanguine suivie par leur liaison avec les bactéries, après opsonisation éventuelle, et phagocytose. Par la suite, le métabolisme oxydatif est stimulé, la fusion phagosome/lysosome se produit et les mécanismes tueurs des lysosomes sont mis en action. La phase finale est représentée par l'élimination des débris et déclenchement de la réponse immunitaire par présentation d'épitopes à la surface en combinaison avec les complexes majeurs d'histocompatibilité (Salyers et Whitt, 1994 ; Czuprynski, 1998).

Les bactéries peuvent se défendre contre la phagocytose à différents étapes de la phagocytose : i) en prévenant l'afflux de cellules phagocytaires ; ii) en évitant la phagocytose elle-même ; iii) ou en échappant à la destruction après la phagocytose, soit par lyse du phagosome, soit par inhibition de la fusion avec les lysosomes, soit par résistance aux mécanismes de destruction des lysosomes (Salyers et Whitt, 1994 ; Czuprynski, 1998).

Comme *E. coli* n'est pas une espèce bactérienne intracellulaire, elle ne pourrait pas survivre après phagocytose. Elle doit donc éviter la phagocytose en prévenant l'afflux de phagocytes ou la phagocytose elle-même. Le mécanisme le plus fréquent est la prévention de la phagocytose elle-même. Cette prévention de la phagocytose est due essentiellement aux polysaccharides de surface comme certains antigènes capsulaires K et les

antigènes somatiques O (Whitfield *et al.*, 1994 ; Hull, 1997 ; Jann et Jann, 1997 ; Czuprynski, 1998).

Parmi les antigènes K, l'antigène K1 est le plus connu des antigènes protecteurs contre la phagocytose chez *E. coli* (Nataro et Levine, 1994 ; Czuprynski, 1998 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

En ce qui concerne les antigènes O, rien n'est connu avec certitude, bien qu'il ait été observé que les mutants « rough » sont phagocytés plus facilement que les souches sauvages « smooth » d'origine (Liang-Takasaki *et al.*, 1982). Cette résistance à la phagocytose semble être due essentiellement à l'impossibilité du complément de se fixer directement sur la paroi bactérienne. Cependant, l'obtention de résultats contradictoires lors d'expériences *in vivo* et *in vitro* nécessite de nombreuses autres expériences pour déterminer les rôles respectifs des antigènes K et O dans la protection d'*E. coli* contre la phagocytose et l'importance de cette protection dans le développement de la maladie.

4.2.3. Le mimétisme moléculaire

Le mimétisme bactérien représente la capacité de la bactérie d'exprimer en sa surface des structures antigéniques similaires aux structures antigéniques spécifiques de l'hôte. Dans ce cas, la virulence de la bactérie peut se concrétiser de deux manières différentes. Dans la première situation due à la ressemblance existante entre le « self » et le « non-self », les molécules impliquées dans le déclenchement de la réponse immunitaire par l'hôte sont incapables de reconnaître l'agent pathogène et, de ce fait, celui-ci va échapper aux réponses immunitaires. Ce mécanisme est utilisé par certains groupes de bactéries comme les *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, qui, pour éviter les mécanismes de défense de l'hôte, vont réaliser le mimétisme en liant des résidus d'acide sialique à leur structures lipooligosaccharidiques (Preston *et al.*, 1996).

La deuxième situation est rencontrée quand les cellules de l'hôte présentent en leur surface des antigènes qui partagent certains épitopes avec des antigènes bactériens. Dans ces cas,

les anticorps produits par l'hôte, lors de l'infection bactérienne (IgM, IgG), réagissent non seulement avec les antigènes spécifiques présents à la surface des bactéries, qui sont à l'origine de leur production, mais aussi avec les cellules de l'hôte, porteurs d'antigènes similaires, voir identiques, à leur surface. Dans certains cas, le mimétisme antigénique se situe à hauteur de la matrice extracellulaire. Les conséquences sont identiques à celles qui suivent la fixation des anticorps sur l'antigène bactérien, mais sont dirigées contre les tissus de l'hôte (cellules, matrice extracellulaire). En effet, la fixation des anticorps sur ces antigènes apparentés aux antigènes microbiens entraîne quatre possibilités de dommages aux cellules et tissus de l'hôte. Tout d'abord l'activation de la cascade du complément par la voie classique provoque, en fin de cascade, le dépôt du complexe MAC dans la membrane cytoplasmique de la cellule eucaryote entraînant sa mort et sa lyse. L'activation de la cascade du complément a aussi comme conséquence l'attraction de phagocytes (neutrophiles, macrophages), dont les contenus lysosomiaux (surtout des neutrophiles), libérés après leur mort, endommagent les tissus de l'hôte (cellules et matrice extracellulaire). Ensuite, l'activité opsonisante de ces anticorps entraîne aussi la phagocytose et la destruction par les macrophages des cellules de l'hôte. Enfin, la fixation des anticorps entraînent la reconnaissance des cellules et tissus de l'hôte par des lymphocytes T NK (« Natural Killers ») porteur de récepteurs (Fcγ) pour l'extrémité Fc des anticorps, qui lysent les cellules auxquelles ils se fixent. Cela a comme résultat la production d'une inflammation autoimmune à médiation cellulaire dépendante d'anticorps. Un exemple dans cette catégorie est *Helicobacter pylori*. Pour ce groupe de bactéries, l'antigène O exprime les antigènes sanguins Lewis X. Les mêmes antigènes Lewis X sont exprimés en surface de l'épithélium gastrique (Moran, 1996 ; Appelmelk *et al.*, 2000). Un autre exemple est la réaction croisée entre le LPS de *Campylobacter jejuni* O:19 et le ganglioside GM1. Elle

est due à une ressemblance moléculaire au niveau du noyau du LPS. Ce mimétisme est le point de départ du syndrome Guillain-Barré, une maladie auto-immune neurodégénérative (Aspinall *et al.*, 1994).

4.2.4. Adhérence aux tissus de l'hôte

L'adhérence est la condition *sine qua non* pour la colonisation de l'hôte par de nombreuses bactéries pathogènes. Le processus d'adhérence se fait par l'intermédiaire de différentes molécules bactériennes capables de reconnaître des récepteurs spécifiques en surface de la cellule cible. Cette spécificité est la base du tropisme d'hôte et de tissu (Jacques, 1996 ; Nataro et Kaper, 1998).

Le rôle joué par le LPS dans le processus d'adhérence a été mis en évidence par des études d'inhibition de l'adhérence par du LPS purifié ou par l'étude de mutants dans la synthèse du LPS dans des tests d'adhérence. La capacité du LPS d'inhiber l'adhérence a été mise en évidence pour le LPS de diverses espèces bactériennes telles que *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni*, et bien d'autres espèces encore (Jacques, 1996). Grâce à la production de mutants dans la synthèse du LPS, un mutant de *Salmonella* Typhimurium qui présente des propriétés d'adhérence diminuées a été identifié (Craven, 1994), tandis qu'un mutant d'*E. coli* O157:H7 qui présente à l'inverse une capacité d'adhérence supérieure à la souche d'origine a été obtenu (Bilge *et al.*, 1996). Ces derniers résultats, apparemment contradictoires, peuvent s'expliquer par le fait que le LPS d'*E. coli* O157:H7 masque des adhésines et que sa mutation peut les « découvrir ». De plus, cette observation permet de conclure que, même si le LPS n'agit pas directement comme une adhésine, il peut interférer avec le processus d'adhérence/colonisation par les bactéries (Bilge *et al.*, 1996).

Le rôle dans l'adhérence n'est pas réservé à une partie du LPS, chaque région peut se lier à des récepteurs spécifiques : CD14 pour le lipide A, lectines pour le noyau et récepteur au mannose pour l'antigène O (Wright *et al.*, 1990 ; Jacques, 1996).

5. CONCLUSIONS

Le LPS est présent sur toutes les bactéries G⁻. Il n'est pas seulement une molécule exprimée en surface de la bactérie, mais aussi un composant important de la membrane externe. Avec sa structure complexe et ses systèmes de biosynthèse, le LPS représente une importante source de variabilité antigénique pour la bactérie, due surtout à la variabilité de l'antigène O. Malgré les efforts et les progrès effectués, certaines étapes de la biosynthèse du LPS attendent encore d'être clarifiées. Suite à sa position en surface de la bactérie, le LPS intervient activement dans la relation hôte-bactérie, avec des implications dans la pathogenèse via deux de ses composants : le lipide A et l'antigène O. Etant donné son rôle dans la pathogénie bactérienne et son rôle dans l'intégrité structurale et fonctionnelle de la bactérie, le LPS constitue une cible non seulement pour la recherche fondamentale, mais aussi pour le secteur biopharmaceutique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier particulièrement le Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement (Division Recherche contractuelle, contrats n° 6011 et n° 6115) et la CE (contrat QLK2-2000-00600) pour l'octroi de subsides dans le cadre des recherches menées sur l'antigène O26 des souches entéropathogènes et entérohémorragiques d'*E. coli*.

SUMMARY

The lipopolysaccharide (LPS) is a major component of the surface of the Gram negative bacteria. The LPS is composed of three separately synthesized entities: the lipid A, the core oligosaccharide and the O antigen, that will be linked together after their respective synthesis. The lipid A, embedded inside the outer

membrane, is the proximal part of the LPS and the core is the medial part, whereas the O antigen represents the distal part free in the external environment. Amongst the *Enterobacteriaceae* family, the lipid A is structurally highly conserved and the variation in the structure of the core oligosaccharide is limited whereas the O antigen is the hypervariable region. Diverse biological activities have been associated with LPS, amongst which the endotoxin activity carried by the lipid A, and the strain immunogenic specificity carried by the O antigen. In this review manuscript we summarize the state of knowledge on the structures and biosynthesis of the different components of the LPS of *Escherichia coli* and on their respective roles in the virulence of pathogenic bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOR K., HEINRICHS D.E., FRIRDICH E., ZIEBELL K., JOHNSON R.P., WHITFIELD C. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 1116-1124.
- ANDERSON M.S., BULL H.G., GALLOWAY S.M., KELLY T.M., MOHAN S., RADIKAK., RAETZ C.R. UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 19858-19865.
- ANDERSON M.S., RAETZ C.R. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 5159-5169.
- ANDERSON M.S., ROBERTSON A.D., MACHER I., RAETZ C.R. Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli* : identification of UDP-3-O-[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine as a precursor of UDP-N2,O3-bis[(R)-3-hydroxymyristoyl]-alpha-D-glucosamine. *Biochemistry*, 1988, **27**, 1908-1917.
- APPELMELK B.J., MONTEIRO M.A., MARTIN S.L., MORAN A.P., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol.*, 2000, **8**, 565-570.
- ASPINALL G.O., FUJIMOTO S., MCDONALD A.G., PANG H., KURJANCZYK L.A., PENNER J.L. Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome patients mimic human gangliosides in structure. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 2122-2125.
- BAILEY M.J., HUGHES C., KORONAKIS V. RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol. Microbiol.*, 1997, **26**, 845-851.
- BASTIN D.A., STEVENSON G., BROWN P.K., HAASE A., REEVES P.R. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol. Microbiol.*, 1993, **7**, 725-734.
- BATCHELOR R.A., HARAGUCHI G.E., HULL R.A., HULL S.I. Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 5699-5704.
- BEAMER L.J., CARROLL S.F., EISENBERG D. The three-dimensional structure of human bactericidal/permeability-increasing protein: implications for understanding protein-lipopolysaccharide interactions. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, **57**, 225-229.
- BILGE S.S., VARY J.C., JR., DOWELL S.F., TARR P.I. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 4795-4801.
- BRAY D., ROBBINS P.W. The direction of chain growth in *Salmonella anatum* O-antigen biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **28**, 334-339.
- BULAWA C.E., RAETZ C.R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacylglucosamine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 4846-4851.
- CAROFF M., KARIBIAN D., CAVAILLON J.M., HAEFFNER-CAVAILLON N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 915-926.
- CARTY S.M., SREEKUMAR K.R., RAETZ C.R. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 9677-9685.
- CLEMENTZ T., RAETZ C.R. A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in *Escherichia coli*. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 9687-9696.
- COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, **420**, 885-891.
- COLLINS L.V., HACKETT J. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 2521-2529.
- CRAVEN S.E. Altered colonizing ability for the ceca of broiler chicks by lipopolysaccharide-deficient mutants of *Salmonella Typhimurium*. *Avian Dis.*, 1994, **38**, 401-408.
- CURRIE C.G., POXTON I.R. The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999, **24**, 57-62.
- CZUPRYNSKI C.J. Bacterial evasion of cellular defence mechanisms: an overview. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, 1998, 141-160.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DIPADOVA F.E., BRADE H., BARCLAY G.R., POXTON I.R., LIEHL E., SCHUETZE E., KOCHER H.P., RAMSAY G., SCHREIER M.H., MCCLELLAND D.B.L., RIETSCHLE T.A. Broadly Cross-Protective Monoclonal-Antibody Binding to *Escherichia coli* and *Salmonella* Lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 3863-3872.
- ERRIDGE C., BENNETT-GUERRERO E., POXTON I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 837-851.
- FUJIHARA M., MUROI M., TANAMOTO K., SUZUKI T., AZUMA H., IKEDA H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopol-

- ysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.*, 2003, **100**, 171-194.
- GIBB A.P., BARCLAY G.R., POXTON I.R., DI PADOVA F. Frequencies of lipopolysaccharide core types among clinical isolates of *Escherichia coli* defined with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.*, 1992, **166**, 1051-1057.
- GRAM C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 1884, **2**, 185-189.
- HAMANN L., EL SAMALOUTI V., ULMER A.J., FLAD H.D., RIETSCH E.T. Components of gut bacteria as immunomodulators. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **41**, 141-154.
- HANCOCK R. E. W., KARUNARATNE, D. N., et BERNEGGER-ELI, C. Molecular organisation and structural role of outer membrane macromolecules. In : Ghuyssen J.-M., Hakenbeck R. (Eds.), *Bacterial cell wall, new comprehensive biochemistry*. Elsevier Science : Amsterdam, 1994, 263-279.
- HEINRICH D.E., YETHON J.A., AMOR P.A., WHITFIELD C. The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific beta-glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 29497-29505.
- HELANDER I.M., LINDNER B., BRADE H., ALTMANN K., LINDBERG A.A., RIETSCH E.T., ZHRINGER U. Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd-/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. *Eur. J. Biochem.*, 1988, **177**, 483-492.
- HITCHCOCK P.J., LEIVE L., MAKELA P.H., RIETSCH E.T., STRITTMATTER W., MORRISON D.C. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J. Bacteriol.*, 1986, **166**, 699-705.
- HOBBS M., REEVES P.R. The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. *Mol. Microbiol.*, 1994, **12**, 855-856.
- HULL S. *Escherichia coli* lipopolysaccharide in pathogenesis and virulence. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli : mechanisms of virulence*. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 145-167.
- INOHARA N., OGURA Y., NUNEZ G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, **5**, 76-80.
- JACKMAN J.E., RAETZ C.R., FIERKE C.A. Site-directed mutagenesis of the bacterial metalloamidase UDP-(3-O-acyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC). Identification of the zinc binding site. *Biochemistry*, 2001, **40**, 514-523.
- JACQUES M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.*, 1996, **4**, 408-409.
- JANN K., JANN B. Capsules of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli : mechanisms of virulence*. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 113-143.
- JOINER K.A., SCHMETZ M.A., GOLDMAN R.C., LEIVE L., FRANK M.M. Mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect. Immun.*, 1984, **45**, 113-117.
- KEENLEYSIDE W.J., PERRY M., MACLEAN L., POPPE C., WHITFIELD C. A plasmid-encoded *rfb* O:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Mol. Microbiol.*, 1994, **11**, 437-448.
- KEENLEYSIDE W.J., WHITFIELD C. Lateral transfer of *rfb* genes: a mobilizable ColE1-type plasmid carries the *rfb* O:54 (O:54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 5247-5253.
- KEENLEYSIDE W.J., WHITFIELD C. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 28581-28592.
- KELLY T.M., STACHULA S.A., RAETZ C.R., ANDERSON M.S. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase: the third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 19866-19874.
- KLENA J.D., PRADEL E., SCHNAITMAN C.A. The *rfaS* gene, which is involved in production of a rough form of lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12, is not present in the *rfa* cluster of *Salmonella* Typhimurium LT2. *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 1524-1527.
- KNEIDINGER B., MAROLDA C., GRANINGER M., ZAMYATINA A., MCARTHUR F., KOSMA P., VALVANO M.A., MESSNER P. Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-beta-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 363-369.
- KUHN H.M., MEIER-DIETER U., MAYER H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1988, **4**, 195-222.
- LIANG-TAKASAKI C.J., MAKELA P.H., LEIVE L. Phagocytosis of bacteria by macrophages: changing the carbohydrate of lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. *J. Immunol.*, 1982, **128**, 1229-1235.
- LIU D., COLE R.A., REEVES P.R. An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2102-2107.
- MCGRATH B.C., OSBORN M.J. Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 649-654.
- MEIER-DIETER U., BARR K., STARMAN R., HATCH L., RICK P.D. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 746-753.

- MORAN A.P. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 1996, **10 Suppl 1**, 39-50.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- NATARO J.P., LEVINE M.M. *Escherichia coli* diseases in humans. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 285-333.
- NIKAIDO H. Outer membrane. In: Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Umberger H.E (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology: Washington, 1994, 29-47.
- NIKAIDO H., VAARA M. Outer membrane. In: Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Umberger H.E (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology: Washington, 1987, 7-22.
- O'NEILL L.A., BROWN Z., WARD S.G. Toll-like receptors in the spotlight. *Nat. Immunol.*, 2003, **4**, 299-
- OSBORN M.J., RICK P.D., RASMUSSEN N.S. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella* Typhimurium. Translocation and integration of an incomplete mutant lipid A into the outer membrane. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 4246-4251.
- PERERA P.Y., MAYADAS T.N., TAKEUCHIO., AKIRAS., ZAKSZILBERMAN M., GOYERT S.M., VOGEL S.N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 574-581.
- POLTORAK A., HE X., SMIRNOVA I., LIU M.Y., VAN HUFFEL C., DU X., BIRDWELL D., ALEJOS E., SILVA M., GALANOS C., FREUDENBERG M., RICCIARDI-CASTAGNOLI P., LAYTON B., BEUTLER B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, **282**, 2085-2088.
- POPOFF M.Y., LE MINOR L. Expression of antigenic factor O:54 is associated with the presence of a plasmid in *Salmonella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1985, **136B**, 169-179.
- PRESCOTT L.M., HARLEY J.P., KLEIN D.A. Microbiologie. De Boeck Université: Bruxelles, 2003, 1136 p.
- PRESTON A., MANDRELL R.E., GIBSON B.W., APICELLA M.A. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1996, **22**, 139-180.
- RAETZ C.R. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, **59**, 129-170.
- RAETZ C.R., WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, **71**, 635-700.
- RAETZ C.R.H. Bacterial Lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology: Washington, 1994, 1035-1063.
- RAY B.L., PAINTER G., RAETZ C.R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 4852-4859.
- RAY B.L., RAETZ C.R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 1122-1128.
- REEVES P. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharides. In: Ghuyssen J.-M., Hakenbeck R. (Eds.), *Bacterial cell wall, new comprehensive biochemistry*. Elsevier Science: Amsterdam, 1994, 281-317.
- REEVES P.R., HOBBS M., VALVANO M.A., SKURNIK M., WHITFIELD C., COPLIN D., KIDO N., KLENA J., MASKELL D., RAETZ C.R., RICK P.D. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.*, 1996, **4**, 495-503.
- RICK P.D., SILVER R.P. Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides. In: Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M., Umberger H.E (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology: Washington, 1987, 648-662.
- RIETSCHER E.T., KIRIKAE T., SCHADE F.U., ULMER A.J., HOLSTO., BRADEH., SCHMIDT G., MAMAT U., GRIMMECKE H.D., KUSUMOTO S. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*, 1993, **187**, 169-190.
- ROBBINS P.W., BRAY D., DANKERT B.M., WRIGHT A. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science*, 1967, **158**, 1536-1542.
- ROCCHETTA H.L., BURROWS L.L., PACAN J.C., LAM J.S. Three rhamnosyltransferases responsible for assembly of the A-band D-rhamnan polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a fourth transferase, WbpL, is required for the initiation of both A-band and B-band lipopolysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.*, 1998, **28**, 1103-1119.
- ROCCHETTA H.L., LAM J.S. Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 4713-4724.
- SALYERS A.A., WHITT D.D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press: Washington, 1994, 418 p.
- SALYERS A.A., WHITT D.D.

- Bacterial pathogenesis : a molecular approach. 2nd Ed. ASM Press : Washington, 2002, 539 p.
- SANDKVIST M. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.*, 2001, **40**, 271-283.
- SCHNAITMAN C.A., KLENA J.D. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1993, **57**, 655-682.
- SORENSEN P.G., LUTKENHAUS J., YOUNG K., EVELAND S.S., ANDERSON M.S., RAETZ C.R. Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase in *Escherichia coli*. The second enzymatic step of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 25898-25905.
- SZALO I.M., TAMINIAU B., GOFFAUX F., PIRSON V., MCCAPPIN J., BALL H.J., MAINIL J.G. 2F3 monoclonal antibody recognizes the O26 O-antigen moiety of the lipopolysaccharide of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 4276. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, **11**, 532-537.
- TANAMOTO K., ZHRINGER U., MCKENZIE G.R., GALANOS C., RIETSCHER E.T., LUDERITZ O., KUSUMOTO S., SHIBA T. Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus amoebocyte* lysate. *Infect. Immun.*, 1984, **44**, 421-426.
- TRIAANTAFILOU M., MIYAKE K., GOLENBOCK D.T., TRIANTAFILOU K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.*, 2002, **115**, 2603-2611.
- WANG L., LIU D., REEVES P.R. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2598-2604.
- WANG L., REEVES P.R. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 3545-3551.
- WHITFIELD C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.*, 1995, **3**, 178-185.
- WHITFIELD C., AMOR P.A., KOPLIN R. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.*, 1997, **23**, 629-638.
- WHITFIELD, C., KENLEYSIDE, W. J., et CLARKE, B. R. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Escherichia coli*. In : Gyles, C (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 437-494.
- WHITFIELD C., ROBERTS I.S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, 1307-1319.
- WRIGHT S.D., RAMOS R.A., TOBIAS P.S., ULEVITCH R.J., MATHISON J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, **249**, 1431-1433.
- YOUNG K., SILVER L.L., BRAMHILL D., CAMERON P., EVELAND S.S., RAETZ C.R., HYLAND S.A., ANDERSON M.S. The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 30384-30391.