

Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud XI

Ecole Doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Spécialité : Microbiologie et Génétique Moléculaire

Présentée par

Houda Bouraoui

Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud XI

Régulation de MtlR, activateur transcriptionnel de l'opéron *mtl* de *Bacillus subtilis*, par le domaine EIIB du transporteur du mannitol

Soutenue le **27 septembre 2012**, devant le jury composé de :

M^{me} Suzanne Sommer	Pr. Université Paris-Sud XI	Président de jury
M^{me} Anne Galinier	Directeur de recherche, CNRS-LCB, Marseille	Rapporteur
M. Christophe Grangeasse	Directeur de recherche, CNRS- IBCP, Lyon	Rapporteur
M. Harald Putzer	Directeur de recherche, CNRS- IBPC, Paris	Examineur
M. Josef Deutscher	Directeur de recherche, CNRS-MiCALIS	Directeur de thèse
M. Philippe Joyet	CR, INRA Jouy-en-Josas	Membre invité

Unité de Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé MICALIS-UMR 1319
INRA/AgroParisTech

Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud XI

Ecole Doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Spécialité : Microbiologie et Génétique Moléculaire

Présentée par

Houda Bouraoui

Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud XI

Régulation de MtlR, activateur transcriptionnel de l'opéron *mtl* de *Bacillus subtilis*, par le domaine EIIB du transporteur du mannitol

Soutenue le **27 septembre 2012**, devant le jury composé de :

M^{me} Suzanne Sommer	Pr. Université Paris-Sud XI	Président de jury
M^{me} Anne Galinier	Directeur de recherche, CNRS LCB, Marseille	Rapporteur
M. Christophe Grangeasse	Directeur de recherche, CNRS- IBCP, Lyon	Rapporteur
M. Harald Putzer	Directeur de recherche, CNRS- IBPC, Paris	Examineur
M. Josef Deutscher	Directeur de recherche, CNRS-MiCALIS	Directeur de thèse
M. Philippe Joyet	CR, INRA- Jouy-en-Josas	Membre invité

Mes remerciements

Un nouveau passage dans la vie des autres et celui d'autres personnes dans ma vie. Un passage qui m'a permis de surmonter des échecs et d'attendre toujours Demain. Ce passage m'a permis aussi de le couronner par cette thèse.

Et pour finir,

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : le professeur Suzanne Sommer, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et les docteurs Anne Galinier et Christophe Grangeasse pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également M. Harald Putzer d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je leur suis reconnaissante pour toutes les corrections et suggestions qu'ils apporteront.

Mes remerciements vont aussi à l'école doctorale « Gènes, Génomes, Cellules », au directeur de l'UMR 2585 AgroParisTech-CNRS-INRA de Grignon, à mon arrivée, M. Jean-Marie Beckerich et au directeur de l'Unité MiCALIS, M. Stéphane Aymerich.

Je ne peux oublier de remercier la Islamic Development Bank et le directeur de son bureau de bourse M. Shaharuqul Huq d'avoir financé mon séjour pour réaliser cette thèse, de leur compréhension et de leur soutien permanent. J'espère pouvoir honorer mon engagement et pouvoir transmettre tout ce que cette thèse m'a permis d'apprendre.

Je remercie tous le personnel du rectorat, de la faculté des Sciences et du Département de Biologie de l'Université Hadj Lakhder de Batna-Algérie pour toutes les facilités qu'ils m'ont accordées pour la gestion administrative de mon détachement.

J'aimerais remercier vivement mon directeur de thèse, Josef Deutscher, du soutien qu'il a apporté à mon travail de doctorant. Je tiens également à le remercier pour la confiance et la sympathie qu'il m'a témoignées au cours de ces trois années de thèse. Je le remercie aussi pour son humanité qui m'a facilité pas mal de choses. J'ai l'immense honneur de partager avec lui cette formation et ce travail.

Je remercie vivement Sandrine pour la formation très précieuse qu'elle m'a prodiguée, pour son soutien permanent et pour ses conseils précieux.

Je tiens à remercier Phillippe pour ses conseils et sa contribution dans l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont à tous les membres de l'équipe de 'Josef', Eliane, Francine, Arthur et à Alexa. Je dis merci à Hamid et Meriem pour le plus qu'ils m'ont apporté juste par leur présence. Je remercie 'bezaf bezaf' Meriem pour son investissement immense dans la mise en page de ce manuscrit. Eh Meriem, après mon départ les vendredis ne seront plus les mêmes....

Je remercie ANNE pour tout ce qu'elle a fait pour moi lorsque j'étais seule et j'avais besoin d'aide et à Sylvie pour les longues et les courtes discussions.

Des remerciements particuliers à Abderahmane, Charlotte, Lei, Cécile D. et à Jamila N. A. pour son écoute et ses conseils durant ma première année de thèse difficile.

Mes remerciements vont à tout le personnel de l'unité pour leur sympathie, leur gentillesse et leur disponibilité en cas de besoin.

Lorsque c'est étroit en bas, c'est vaste là haut...pas au ciel mais juste à l'étage, merci Christelle pour toutes les discussions et les bons moments qu'on a partagé, merci M. Label J.G., on ne peut passer dans ce laboratoire sans laisser au moins une confiance au chef....A la fin je suis contente que vous ayez fini par descendre pour me voir.

Un grand Merci à M^{me} Colleu, la gestionnaire de la résidence Ratineau et tout le personnel de la crèche Les Petits Chaperons Rouges où ma fille a passé trois ans de merveilles, quel bonheur d'avoir une place dans une telle crèche.

Mes remerciements vont aux familles, Benkara, Hamel et Meriem Mokrani, même s'ils pensent qu'ils n'ont rien fait pour moi, je tiens à dire que lorsque on fait une thèse loin de chez soi c'est précieux de sentir un peu de ce chez soi.

A toutes mes amies qui étaient de tout cœur avec moi, loin des yeux près du cœur, eh oui ça marche entre les amis.

Est-ce que je remercie ma famille ou je lui dédie ce travail? Les deux et... c'est peu. A ma grande famille, mon père et ma mère, mes sœurs et frères, pour tout ce qu'ils ont géré à ma place et pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Je suis sûre qu'ils sont fiers de moi, d'ailleurs comme toujours. A ma belle famille qui m'a soutenue du début à la fin de ce projet.

A Ahmed, mon époux pour tous les sacrifices qu'il a fait pour que je puisse réaliser cette thèse, tu es impatient mais tu finis toujours par m'aider...Merci et Pardon pour tous les bons et les mauvais moments que cette thèse t'a privé de partager avec la famille. A ma Rayane, même si tu ne comprends pas grand chose, même rien, de ce que maman fait, tu es mon bonheur absolu qui me booste me booste à l'infini.

A toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des Matières

Introduction bibliographique

I. <i>Bacillus subtilis</i>, "top" modèle des bactéries à Gram positives	2
II. Le système phosphotransférase	4
II.1. Description générale des composants du PTS	6
II.1.1. Les enzymes générales	6
II.1.1.1. L'enzyme I (EI)	6
II.1.1.2. La protéine HPr	8
II.1.2. Les enzymes spécifiques du PTS	9
II.1.2.1. L'enzyme II	9
II.1.3. Les PTS du <i>Bacillus subtilis</i>	11
II.2. Le PTS, un système central de régulation	12
II.2.1. Le rôle de la phosphorylation de HPr dans la répression catabolique	14
II.2.2. CcpA	16
II.2.3. Exclusion d'inducteur	18
II.2.4. Les protéines à domaines PRD	19
II.2.4. 1. Les aniterminateurs à domaines PRD	19
II.2.4. 1. Les activateurs transcriptionnels	21
III. Le catabolisme du mannitol chez les bactéries	23

Matériel et Méthodes

I. Souches et cultures	32
I.1. Souches bactériennes	32
I.2. Vecteurs plasmidiques	34
I.3. Milieux de culture	36
I.4. Conservation des souches	37
II. Techniques de biologie moléculaire	37
II.1. Préparation de l'ADN génomique bactérien	37
II.2. Préparation des ADN plasmidiques	38
II.3. Amplification par réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	39
II.4. PCR trois voies	39
II.5. Electrophorèse des fragments d'ADN	41

II.6. Purification de l'ADN	41
II.7. Restriction de fragments d'ADN	42
II.8. Ligature des fragments d'ADN	42
II.9. Manipulation de l'ARN	42
II.9.1. Extraction de l'ARN	42
II.9.2. Traitement à la DNase de l'ARN	43
II.9.3. Vérification par PCR de l'ARN traité	43
II.9.4. La Reverse Transcription (RT) de l'ARN	43
II.9.5. La PCR quantitative	44
III. Techniques de transformation et de criblages des mutants	44
III.1. Transformation de bactéries compétentes	44
III.1.a. Préparation de bactéries électrocompétentes de <i>E. coli</i>	45
III.1.b. Electroporation chez <i>E. coli</i>	45
III.1.c. Transformation de <i>B. subtilis</i>	45
III.2. Criblage des transformants	46
III.2.a. Résistances aux antibiotiques	46
III.2.b. Vérifications des clones par PCR	46
III.2.c. Le séquençage	46
III.3. Construction des mutants et des vecteurs	46
IV. Détermination de l'interaction des protéines par le test double hybride	52
IV.1. Double hybride chez la levure	52
IV.2. Préparation des cellules compétentes	52
IV.3. Transformation par choc thermique	53
IV.4. Détermination des interactions en double hybride chez la levure	53
V. Mesure de l'activité β- galactosidase	54
Résultats et Discussion	56
Conclusion générale et perspectives	102
Annexe	105
Références bibliographiques	114

Liste des figures

Figure 1	Organisation générale du PTS chez <i>Bacillus subtilis</i>	5
Figure 2	Organisation structurale des deux monomères de l'enzyme EI	7
Figure 3	Ensemble des mécanismes sous tendant la répression/activation catabolique chez les firmicutes	16
Figure 4	Le mécanisme de la répression catabolique CcpA dépendant chez les firmicutes	18
Figure 5	Structure des domaines de l'antitermineur LicT et des activateurs transcriptionnels LevR et LicR chez <i>B. subtilis</i> .	22
Figure 6	Interaction du complexe EIIA ^{Mtl} -HPr chez <i>E. coli</i>	26
Figure 7	L'organisation de l'opéron mannitol chez certaines bactéries	28
Figure 8	Organisation de MtlR de quelques firmicutes et LicR de <i>Bacillus subtilis</i>	30
Figure 9	Cartes de quelques plasmides utilisés dans cette étude	34
Figure 10	Schéma de la PCR 3 voies	40
Figure 11	Le système double hybride dans la levure	53
Figure 12	Description des différentes étapes du test double hybride	54
Figure 13	Expression de la fusion <i>Pmtl-lacZ</i> dans les mutants $\Delta 3'$ - <i>mtlA</i> Δ <i>mtlF</i> et Δ <i>mtlAFD</i> sans et avec la complémentation avec MtlA, MtlACys 396Ala et MtlA Cys396 Asp.	60
Figure 14	Croisement par double hybride (L'interaction entre EIIB ^{Mtl} et MtlR selon différentes formes de phosphorylation)	93
Figure 15	Localisation de la protéine fusionnée GFP-MtlR dans la souche PJ001 et le mutant Δ <i>mtlAFD</i>	95
Figure 16	Modèles schématisant la séquestration de MIC et de BglG à la membrane et son effet sur l'activité des opérons <i>ptsG</i> et <i>bgl</i> respectivement	99
Figure 17	Modèle proposé pour la régulation de l'expression de l'opéron <i>mtl</i> via l'activation de MtlR.	103
Figure 18	L'opéron <i>mal</i> et la région <i>yvdE-pgcM</i> chez <i>B.subtilis</i>	106
Figure 19	Déphosphorylation de la P-Ser-HPr en présence de la GST-Yvdi	109
Figure 20	Co-purification des protéines GST-YvdiA et P-Ser46D-HPr	110

Liste des tableaux

Tableau 1	Les principales fonctions du PTS	6
Tableau 2	Les familles des EIICs selon Transport Commission (TC) classification	11
Tableau 3	Les systèmes de transport PTS chez <i>Bacillus subtilis</i>	13
Tableau 4	Comparaison de la taille des MtlA (EIICB ^{Mtl}), MtlF (EIIA ^{Mtl}) et MtlR et leurs sites de phosphorylation chez plusieurs firmicutes et de MtlA (EIICBA ^{Mtl}) de <i>E. coli</i> .	29
Tableau 5	Les souches utilisées dans cette étude	32-33
Tableau 6	Liste des vecteurs construits et utilisés dans cette étude	35-36
Tableau 7	Composition des milieux utilisés pour la transformation de <i>B.subtilis</i>	37
Tableau 8	Programme des réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	39
Tableau 9	Programme des réactions de la PCR 3 voies	41
Tableau 10	Les amorces utilisées pour la qPCR	44
Tableau 11	Programme utilisé pour la qPCR	44
Tableau 12	La liste des amorces utilisées dans cette étude	47-48
Tableau 13	Les protéines clonées dans pGBDU et pGAD et la liste des amorces utilisées	51

Introduction

I. *Bacillus subtilis*, "top" modèle des bactéries à Gram positives

Membre du phylum *Firmicutes*, famille des *Bacillaceae*, *Bacillus subtilis* est une bactérie à Gram+, aéro-anaérobie facultative, mésophile et chimiohétérotrophe. Elle a une forme de bâtonnet et est recouverte d'une ciliature péritriche.

B. subtilis a été identifiée pour la première fois en 1835 par Christian Gottfried Ehrenberg sous le nom de *Vibrio subtilis*. Et en 1872, Ferdinand Cohn la renomme en son nom actuel, *Bacillus*.

B. subtilis est une bactérie ubiquitaire, qu'on trouve essentiellement dans le sol (Earl *et al.*, 2008). C'est une bactérie facilement cultivable et manipulable en laboratoire. Elle est employée en industrie pour la production de nombreuses protéines telles que de l'amylase utilisée dans l'industrie du pain, des protéases, des cellulases utilisées dans l'industrie des détergents ou des antibiotiques comme la bacitracine et la polymyxine.

Dans un environnement défavorable et afin d'assurer sa survie en s'adaptant aux changements environnementaux, au moins trois stratégies différentes peuvent être mises en place chez *B. subtilis* : (i) l'entrée en phase stationnaire où les cellules deviennent isolées et mobiles, (ii) un déclenchement de la compétence naturelle afin d'intégrer de l'ADN environnant, ce qui lui confère une capacité d'adaptation par conjugaison (Msadek, 1999) , et enfin, (iii) la formation d'endospores. Les endospores sont extrêmement résistantes à une grande variété de conditions extrêmes telles que la chaleur, le froid, la dessiccation et les radiations (Driks, 2002).

A court terme, la bactérie est aussi capable d'affronter des situations telles que les stress osmotiques, oxydatifs, acides ou les chocs thermiques, en particulier grâce à des régulateurs globaux de réponse au stress, les facteurs *sigma*.

Le comportement social est une autre caractéristique intéressante de *B. subtilis* ; les cellules ont la possibilité de se regrouper entre elles et d'adhérer à des surfaces sous forme de biofilms (Lemon *et al.*, 2008) . Les cellules regroupées peuvent aussi se déplacer en masse grâce à un phénomène appelé *swarming* (Kearns et Losick, 2003). Un système de communication intercellulaire nommé le *quorum sensing* est également présent chez *B. subtilis* (Tortosa *et al.*, 2001b; Tran *et al.*, 2000). Ce mécanisme permet aux cellules de réagir à l'environnement en tant que population bactérienne par modulation coordonnée de

l'expression des gènes en réponse à des changements de densité de la population bactérienne (Waters et Bassler, 2005).

B.subtilis n'est pas considérée comme pathogène mais elle peut occasionnellement provoquer une intoxication alimentaire. En revanche d'autres espèces de *Bacillus* sont pathogènes, c'est le cas de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* pathogènes pour les animaux et les humains ou *Bacillus thuringiensis*, pathogène d'insectes. La non-pathogénicité de *B.subtilis* facilite les manipulations chez cette espèce, et les études menées chez *B. subtilis* ont permis de mieux connaître un grand nombre de pathogènes appartenant au même phylum tel que les staphylococques et les streptocoques.

L'utilisation de *B. subtilis* comme système expérimental a commencé avec « la souche d'origine » de F. Cohn décrite en 1872 et communément appelée « souche Marburg ». En 1958, John Spizizen met en évidence la transformation d'un isolat de *B. subtilis* par de l'ADN exogène (Spizizen, 1958). La souche dite 168 fut sélectionnée pour son efficacité de transformation. Trois ans plus tard, C. Anagnostopoulos définit les conditions de transformation permettant la compétence génétique chez cette bactérie (Anagnostopoulos et Spizizen, 1961). C'est le point de départ de toutes les futures études qui seront menées sur *B. subtilis*, qui est un des organismes les plus étudiés : en effet, parmi les procaryotes, il arrive en seconde position derrière *Escherichia coli*. La séquence de son génome a été publiée la même année (Kunst *et al.*, 1997) que celle d'*Escherichia coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997).

La richesse et le nombre d'informations collectées font de *B. subtilis* une des bactéries les plus utilisées en génétique et biologie cellulaire. Avec ses 4100 phases ouvertes de lecture séquencées, *B. subtilis* est devenu l'organisme modèle pour l'analyse de la physiologie des bactéries à Gram positif ainsi que pour les études cellulaires tels que la réplication, la transcription, la traduction, la réparation et la ségrégation de l'ADN, le cycle cellulaire, la division cellulaire, la sporulation et la morphogénèse.

Mais par la même occasion le séquençage a permis de mettre en évidence combien il reste à découvrir pour une compréhension complète de la fonction des gènes et des protéines et de leurs interactions.

II. Le système phosphotransférase

Les bactéries adaptent leur métabolisme cellulaire aux nutriments disponibles dans le milieu extracellulaire afin de survivre et sont particulièrement sensibles aux substrats carbonés disponibles. Les régulations indispensables s'exercent le plus souvent au niveau du contrôle de la transcription des gènes, mais peuvent impliquer également des phénomènes post-traductionnels. En présence de deux sucres, l'un plus rapidement métabolisable que l'autre, on observe classiquement un comportement diauxique des bactéries, préférant métaboliser dans un premier temps le sucre dit "rapide" suivi d'une phase d'arrêt de croissance et finalement de l'utilisation du sucre "lent" (Thompson *et al.*, 1978). L'existence de ce phénomène suggère une utilisation préférentielle d'un substrat par rapport à un autre. L'ensemble des phénomènes qui permettent, en présence de sucres rapidement métabolisables comme le glucose, de réprimer l'expression des gènes et enzymes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone non préférentielles est regroupé sous le terme de répression catabolique (RC) ; à l'opposé, l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de ces sources préférées de carbone et d'énergie est stimulée.

Le PTS (*phosphoenolpyruvate ::carbohydrate phosphotransferase system*) est l'acteur principal de la RC chez les firmicutes et les entérobactéries. Ce système assure par ailleurs le transport et la phosphorylation de certains hydrates de carbone, dits sucres PTS.

Depuis sa découverte chez *E.coli* (Kundig *et al.*, 1964), le PTS a été mis en évidence chez de très nombreuses bactéries, aussi bien parmi les bactéries à Gram négatif que parmi les bactéries à Gram positif (Tchieu *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 1990; Postma *et al.*, 1993; Saier et Reizer, 1994; Reizer *et al.*, 1999a; Pries *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1993). Le PTS est aussi présent chez des *Spirochaetales*, les Mollicutes et même quelques Archaeae possèdent un PTS (Bolhuis *et al.*, 2006).

Bien que le PTS semble spécifique aux bactéries (Barabote et Saier, 2005) un gène codant pour une composante de ce système (la protéine HPr) a été retrouvé chez un champignon (*Aspergillus fumigatus* (Barker *et al.*, 1991). Néanmoins, l'HPr d'*A. fumigatus* montre une identité de 100% à la HPr de *Leuconostoc lactis*, ce qui peut suggérer que le champignon a obtenu le gène *ptsH* par transfert horizontal à partir de ce firmicute. Le génome d'*Aspergillus flavus* contient également un homologue de *ptsH*, qui code pour une protéine (numéro d'accès **B8N2T8**)¹ montrant autour de 50% d'identité aux HPr de Clostridia.

1: Genome sequence of *Aspergillus flavus* strain NRRL 3357. Payne W.G.A., Dean R.A., Nierman W.C., Amedeo P., Caler E.G.A., Fedorova N.D., Maiti R., Joardar V., Inman J., Galinsky K.J., Yu J., Bhatnagar D., Cleveland T.E., submitted to EMBL data bank 2007.

Le PTS est constitué de plusieurs protéines, dont la composition de base est identique chez presque toutes les espèces étudiées (Postma *et al.*, 1993). On peut faire la distinction entre les composantes dites générales du PTS (l'enzyme I et la protéine HPr) qui chez les firmicutes participent au transport de tous les sucres PTS et les composantes spécifiques d'un sucre ou d'un groupe de sucres transportés (enzymes II) (voir Figure 1).

En présence de sucre-PTS dans le milieu, les protéines du PTS catalysent une cascade de phosphorylation qui aboutit à la phosphorylation du sucre transporté. L'EI s'autophosphoryle aux dépens du phosphoénolpyruvate (PEP), un intermédiaire de la glycolyse, qui a le double rôle de donneur initial de phosphate et de source d'énergie pour le transport. P~EI transfère son phosphate sur le résidu histidine 15 de l'HPr qui le transfère à son tour à l'enzyme EIIA puis à l'EIIB spécifiques du sucre. Enfin, le phosphate est transféré au sucre fixé à l'EIIC dans la membrane et qui est, par la suite, libéré dans le cytoplasme en forme phosphorylée.

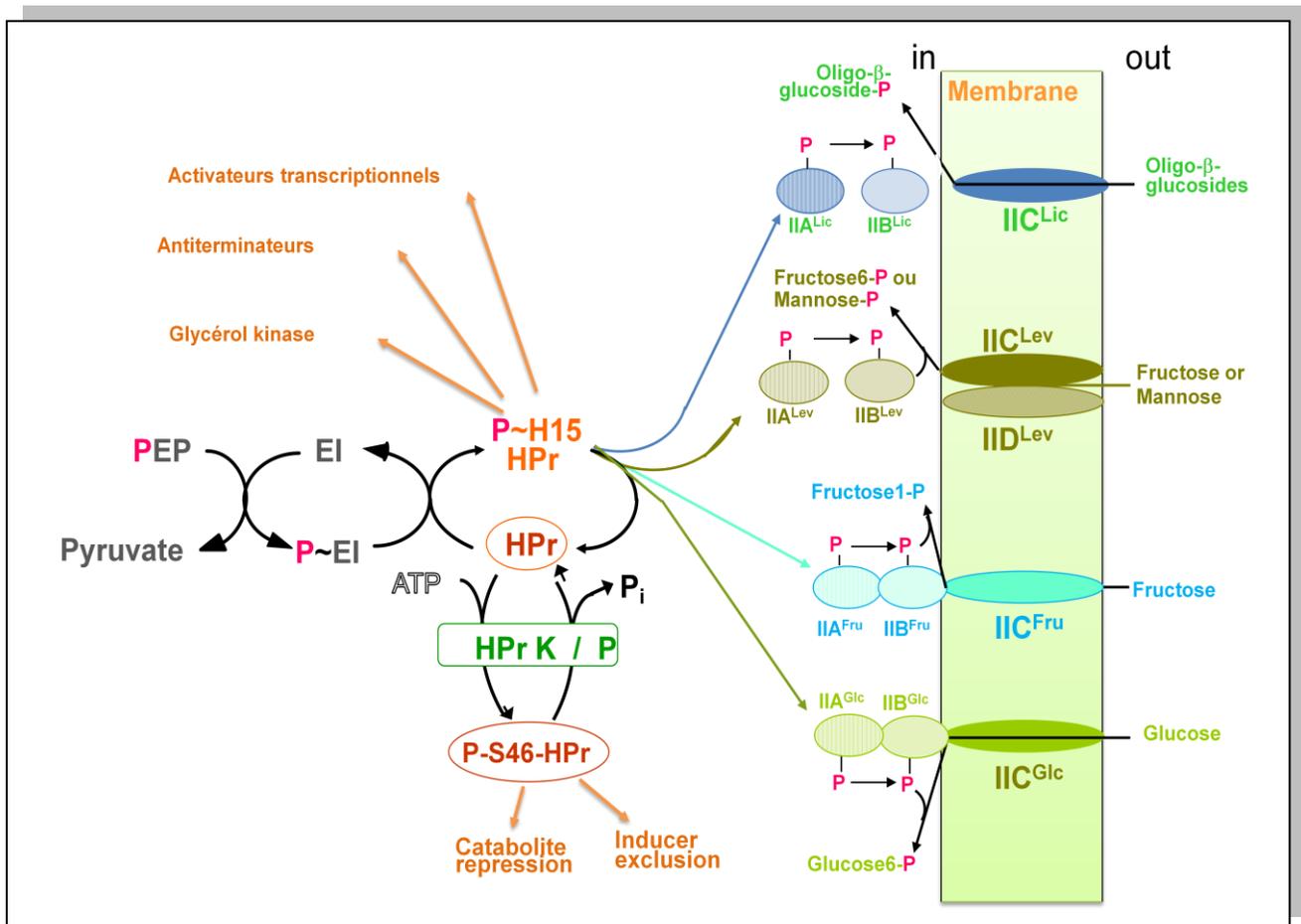


Figure 1 : Organisation générale du PTS chez *Bacillus subtilis*

Lorsque le PTS a été découvert, une seule fonction lui a été attribuée: la phosphorylation des sucres. Aujourd'hui, il est montré que ce système joue plusieurs rôles dans les différents aspects de la physiologie bactérienne ainsi que la régulation transcriptionnelle et métabolique (Saier *et al.*, 1995; Postma *et al.*, 1993) (Tableau 1).

Tableau 1. Les principales fonctions du PTS (Saier *et al.*, 1995)

Fonctions du PTS			
Transport et Phosphorylation des sucres	Régulation du transport et du métabolisme des sucres non-PTS	Régulation de la mobilité cellulaire	Régulation de la physiologie cellulaire
Phosphorylation des protéines	Régulation de la fermentation versus respiration	Coordination du métabolisme du nitrogène et du carbone	Régulation de la division cellulaire
Régulation du métabolisme du carbone	Régulation de l'expression des gènes	Régulation du transport des composés non-carbonés	Régulation de la virulence

Comment un seul système peut-il réguler tant de différents processus ?

Les protéines du PTS phosphorylent ou interagissent avec une multitude de protéines cytoplasmiques ou membranaires. Ces activités dépendent du niveau de phosphorylation des protéines du PTS, qui change en réponse à la concentration en PEP et pyruvate à l'intérieur de la cellule, qui elle-même dépend de l'activité glycolytique et de la présence d'un sucre inducteur ou répresseur dans l'environnement.

Parce que le PTS répond à de multiples et divers signaux, il doit être complexe et variable.

II.1. Description générale des composants du PTS

II.1.1. Les enzymes générales

II.1.1.1. L'enzyme I (EI)

Une protéine, de taille comprise entre 59 et 64 kDa, l'enzyme I est très conservée. Chez *B. subtilis*, EI est une protéine cytoplasmique de 570 acides aminés dont la masse moléculaire est de 63 kDa (Gonzy-Tréboul et Steinmetz, 1987). Premier maillon de la chaîne de phosphorylation, EI s'autophosphoryle au niveau de l'azote N3 du noyau imidazole d'un

résidu histidine conservé en utilisant le PEP comme donneur de phosphate (Weigel *et al.*, 1982); (Alpert *et al.*, 1985), ce processus nécessitant la présence de cations bivalents comme le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} .

Les EIs sont composées de deux domaines fonctionnels, un domaine C-terminal (EIC) et un domaine N-terminal (EIN) (Figure 2) (Postma *et al.*, 1993; Chauvin *et al.*, 1994a). Le domaine EIC médie la dimérisation et se lie au PEP en présence du Mg^{2+} (Zhu *et al.*, 1999). La dimérisation de l'Ei est essentielle à son autophosphorylation (Misset *et al.*, 1980; Seok *et al.*, 1996). C'est la forme phospho-monomérique qui catalyse la phosphorylation d'HPr dont le site de fixation ainsi que la histidine active sont situés dans le domaine N-terminal de EI. (Chauvin *et al.*, 1994a; Chauvin *et al.*, 1994b; Garrett *et al.*, 1997).

Le domaine EIC peut jouer également un rôle dans la spécificité de la phosphorylation entre les différentes espèces, un domaine EIN d'*E.coli* est capable de phosphoryler l'HPr de *Bacillus subtilis* et de *Mycoplasma capricolum* (Seok *et al.*, 1996).

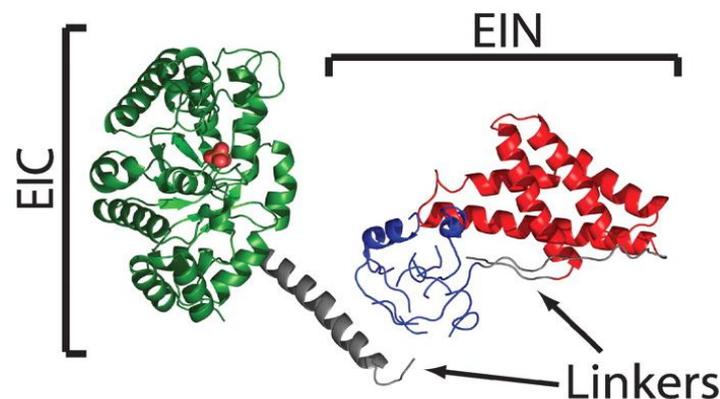


Figure 2 : Organisation structurale des deux monomères de l'enzyme EI (Romero-Beviar *et al.*, 2010).

Les structures des deux domaines de l'EI ainsi que de l'EI entière en forme phosphorylée et non-phosphorylée ont été déterminées (Marquez *et al.*, 2006; Oberholzer *et al.*, 2009; Romero-Beviar *et al.*, 2010; Teplyakov *et al.*, 2006).

II.1.1.2. La protéine HPr

HPr (Heat resistant Protein) a été le sujet d'étude structurale chez de nombreuses bactéries (Gassner *et al.*, 1977; El-Kabbani *et al.*, 1987; Herzberg *et al.*, 1992; Wittekind *et al.*, 1992 ; Kalbitzer *et al.*, 1982; Jia *et al.*, 1994).

Protéine caractérisée par sa stabilité thermique et son faible poids moléculaire, variant de 8 à 10 kDa, l'HPr possède une séquence peu conservée entre les différentes espèces bactériennes (Postma *et al.*, 1993). Cependant, la séquence entourant le site de phosphorylation, l'His -15 (His-14 chez *Bacillus thuringiensis*), est très conservée (Khan *et al.*, 2001).

Située en surface de la protéine (Herzberg *et al.*, 1992), l'His-15 est le site de phosphorylation de l'HPr par P-EI (Gassner *et al.*, 1977). Cette phosphorylation n'induit pas de changement majeur dans la conformation d'HPr (Kalbitzer *et al.*, 1982; Weigel *et al.*, 1982). Les deux gènes *ptsI* et *ptsH* qui codent respectivement pour EI et HPr sont regroupés, chez la majorité des Gram positive, dans le même opéron, l'opéron *ptsHI*.

Chez *B.subtilis* on trouve le gène *ptsG*, codant pour la EII^{Glc}, en amont du l'opéron *ptsHI*. Il y a un promoteur en amont de *ptsHI* et un autre en amont de *ptsG*. Le dernier est activé par la présence du glucose et permet la synthèse de l'ARNm comprenant *ptsGHI* (Stülke *et al.*, 1997). Des localisations différentes des gènes *ptsH* et *ptsI* ont été décrites pour *Mycolpasma* (Zhu *et al.*, 1993), pour la bactérie à GC élevé, *Streptomyces coelicolor* (Parche *et al.*, 1999), pour *Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998) et de nombreuses protéobactéries.

L'HPr sous ses différentes formes joue un rôle central dans la régulation transcriptionnelle des gènes soumis à la régulation catabolique et dans l'exclusion de l'inducteur (Deutscher *et al.*, 2006).

À l'encontre d'*E.coli*, qui possède des gènes codant pour cinq paralogues d'HPr (HPr, FPr, NPr, DPr, TPr) (Blattner *et al.*, 1997; Reizer et Saier, 1997) dans le chromosome de *Bacillus subtilis* il n'y a qu'un seul gène codant une protéine qui présente 45 % d'identité de séquence avec HPr, la protéine Crh (catabolite repression HPr) (Galinier *et al.*, 1997). L'histidine en position 15 dans HPr étant remplacée par une glutamine non phosphorylable dans Crh, cette dernière ne joue pas de rôle dans le transport et la phosphorylation des sucres (Galinier *et al.*, 1999). Cependant la protéine Crh possède une Ser- 46 phosphorylable et comme la P-Ser-HPr, la P-Ser-Crh est impliquée dans la répression catabolique par l'interaction avec CcpA.

Chez *B.subtilis*, Crh semble interagir avec CcpA et participe dans l'activation du gène *ackA* qui code pour l'acétate kinase (Turinsky *et al.*, 1998). Elle participe aussi à la répression catabolique de l'opéron *xyn* où la RC *via* CcpA est partiellement maintenue dans un mutant *ptsHI* où l'HPr n'est pas phosphorylée sur la serine 46 (Galnier *et al.*, 1998). Il semble aussi que Crh joue un rôle spécifique dans la RC du gène *citM* codant pour la principale protéine impliquée dans le transport du citrate chez *B. subtilis*. Dans un mutant Crh le taux de la transcription de *citM* est 2.9 fois plus que celui observé dans une souche sauvage. cette RC Crh dépendante est observée seulement en présence du citrate et du succinate dans le milieu de culture (Warner et Lolkema, 2003). Récemment il a été reporté que Crh interagit avec l'enzyme méthylglyoxal synthase MgsA, l'enzyme clé dans la formation du méthylglyoxal par le bypass de la glycolyse. L'activité de MgsA est inhibée par la Crh non phosphorylée en présence de source de carbone non favorable et pour cela il est proposé que Crh peut contrôler le flux glycolytique (Landmann *et al.*, 2011).

II.1.2. Les enzymes spécifiques du PTS

La spécificité de la translocation des carbohydrates par le PTS réside dans le complexe enzymatique EII, plus spécifiquement dans l'EIIC (ou EIIC et EIID), qui fixe spécifiquement le sucre et qui est appelé également perméase.

II.1.2.1. L'enzyme II

Le complexe enzyme II est constitué de trois ou quatre domaines fonctionnels ou protéines distinctes appelés EIIA, EIIB, EIIC (et parfois EIID comme EIID^{Man} chez *E.coli*). (Postma *et al.*, 1993;Khan *et al.*, 2001).

- Les EIIA sont des domaines ou protéines hydrophiles, cytoplasmiques ou attachés à la membrane (fusionnés avec un domaine EIIC), composés d'environ 140-170 acides aminés, et toujours phosphorylés sur un résidu histidine.
- Les EIIB sont aussi des domaines ou protéines hydrophiles composés d'une centaine d'acides aminés. Le transfert du groupement phosphate de EIIA vers EIIB a lieu sur une histidine (famille mannose) et sur une cystéine dans le reste des cas (Pas et Robillard, 1988). EIIB est associée au domaine membranaire EIIC pour catalyser la phosphorylation du sucre ce qui permet le relargage du sucre phosphorylé dans le cytoplasme par EIIC.

- EIIC correspond à la perméase spécifique permettant le transport d'un ou de plusieurs sucres. C'est un domaine protéique hydrophobe d'environ 350 acides aminés formant 6 ou 8 hélices transmembranaires (Kotrba *et al.*, 2001) et une boucle hydrophile interagissant avec le domaine EIIB. Il est à noter que les PTS de la classe mannose possèdent une protéine additionnelle, nommée EIID qui, associée à EIIC, forme la perméase pour le sucre correspondant.

Les gènes qui codent les différentes EIIs d'un PTS sont en général rassemblés au sein d'un même opéron, ce qui permet une expression concertée de toutes les EIIs impliquées dans le transport d'un même sucre. Cependant, certains opérons codant un PTS de la classe glucose ne renferment pas de gène codant une EIIA. Chez *B.subtilis* six des 9 PTS de la classe glucose/sucrose utiliseraient l'EIIA^{Glc} codé par *ypqE* ou le domaine EIIA de PtsG, l'EIICBA spécifique pour le glucose (Deutscher *et al.*, 2002).

Dans les protéines portant des fusions l'ordre des domaines EIIA, B et C est variable (ABC, ACB, CBA, etc.). Dans quelques cas l'EIIB seule est fusionnée à l'EIIC (PtsG d'*E. coli*), dans d'autres cas EIIA et EIIB sont liées (PTS spécifiques pour glucose/mannose). Basé sur la séquence des EIIC, sept familles du PTS peuvent être distinguées (Le tableau 2).

Les EIIs appartenant à la même famille présentent plus de 25% d'identité (Postma *et al.*, 1993). Le nom des différentes classes provient du sucre transporté par le premier PTS décrit appartenant à cette famille.

Tableau 2. Les familles des EIICs selon Transport Commission (TC) classification (Barabote et Saier, 2005)

Famille, numéro TC	Sous famille	substrats
Glc : Glucose (4.A.1)	Glucose (4.A.1.1)	Glucose, <i>N</i> -acétylglucosamine, maltose, glucosamine, et α -glucosides
	Glucoside (4.A.1.2)	β -Glucosides, sucrose, tréhalose, et acide <i>N</i> -acetylmuramique
Fru : Fructose (4.A.2)		Fructose, mannitol, mannose, et 2- <i>O</i> - α -mannosyl D-glycérate
Lac : Lactose (4.A.3)	Lactose (4.A.3.1)	Lactose, β -glucosides aromatiques, et cellobiose
	<i>N,N'</i> -diacetylchitobiose (4.A.3.2)	<i>N,N'</i> -Diacetylchitobiose et aryl β - oligosaccharides
Gut: Glucitol (4.A.4)		Glucitol (sorbitol) et 2-methyl-d-erythritol
Gat : Galactitol (4.A.5)		Galactitol et D-arabitol
Man : Mannose (4.A.6)		Présente une large spécificité : Glucose, mannose, sorbose, fructose, glucosamine, galactosamine, <i>N</i> -acétylgalactosamine
Asc: ascorbate (4.A.7)		L-Ascorbate (utilisation anaérobique)

II.1.3. Les PTS du *Bacillus subtilis*

L'analyse complète de son génome a permis d'identifier 15 PTS chez *B. subtilis*. Les analyses des séquences et des fonctions de ces dernières ont permis de déterminer les substrats de 14 d'entre elles (Reizer *et al.*, 1999), et les répartir en 4 familles (Tableau 3).

Dans la sous-classe glucose, les deux gènes *yyzE* et *ypqE* codent pour deux protéines EIIA^{Glc}-like. *YpqE* fonctionne probablement avec quelques protéines EIICB de cette sous classe ainsi que la EIICB de la sous classe sucrose. L'implication de la EIIA tronquée, la protéine *YyzE*, dans la cascade de phosphorylation via le PTS n'est pas encore connue. De même, la fonction du gène *ywbA*, qui code une protéine homologue à une perméase EIIC de la classe lactose, reste à découvrir (Reizer *et al.*, 1999b)

Il est à noter que les EIIs de la sous classe sucrose ont l'ordre BC(A) alors que celles de la sous classe glucose présentent l'ordre CB(A). La famille fructose a de variables combinaisons d'ordre des domaines EII (EIICBA, EIIBCA et EIIABC).

II.2. Le PTS, un système central de régulation

La régulation du métabolisme central, et plus particulièrement du métabolisme carboné, constitue un point clé dans l'adaptation environnementale des bactéries. Cette régulation implique des composants du PTS : l'EIIA chez les entérobactéries et la protéine HPr chez les firmicutes. Elle est basée sur plusieurs mécanismes : la répression de l'expression des gènes catabolique en modulant directement l'activité des régulateurs transcriptionnels ainsi que l'exclusion de l'inducteur, qui a des effets indirects sur l'expression des gènes cataboliques. (Blattner *et al.*, 1997). Un ensemble des mécanismes de la répression/activation catabolique chez les firmicutes est schématisé dans la Figure 3.

Le mécanisme de la répression catabolique permet en effet aux bactéries de modifier l'expression de leurs gènes cataboliques en réponse à la disponibilité des sources de carbone rapidement métabolisables, et par conséquent d'installer une certaine hiérarchie dans l'utilisation des sucres. Ce phénomène est parfois appelé « effet glucose » parce que chez de nombreuses bactéries le glucose exerce la plus forte répression catabolique (Galinié *et al.*, 1998).

Tableau 3 : Les systèmes de transport PTS chez *Bacillus subtilis*

Protéines PTS	Structures des domaines	Nombre de Résidus (aa)	Sucre transporté	Références
Classe glucose/sucrose				
Sous-classe glucose				
PtsG	IICBA	699	Glucose	(Gonzy-Tréboul et Steinmetz, 1987)
GamP (YbfS)	IICBA	631	Glucosamine ??	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
NagP (YflF)	IICB	452	N-Acetylglucosamine	(Bertram <i>et al.</i> , 2011)
MalP (GlvC)	IICB	527	Maltose	(Schönert <i>et al.</i> , 2006)
YpqE	IIA	168	Inconnu	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
YyzE	IIA	76	Inconnu	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
Sous-classe sucrose				
BglP	IIBCA	609	Aryl- β -glucosides	(Le Coq <i>et al.</i> , 1995)
YbbF	IIBC	466	Inconnu, β glucosides	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
TreP	IIBC	470	Tréhalose	(Schöck et Dahl, 1996)
SacP	IIBC	460	Sucrose	(Fouet <i>et al.</i> , 1987)
SacX	IIBC	459	Sucrose	(Zukowski <i>et al.</i> , 1990)
Classe lactose				
LicA, LicB, LicC	IIA, IIB, IIC	110,102, 452	Oligo- β glucosides	(Tobisch <i>et al.</i> , 1997)
YdhN, YdhM, YdhO	IIA, IIB, IIC	110, 103,442	Oligo- β -mannosides ??	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
YwbA	IIC	444	Inconnu	(Kunst <i>et al.</i> , 1997) (Glaser <i>et al.</i> , 1993)
Classe fructose/mannitol				
FruA	IIABC	635	Fructose ??	(Kunst <i>et al.</i> , 1997)
MtlA, MtlF	IICB, IIA	621	Mannitol	(Watanabe <i>et al.</i> , 2003)
ManP (YjdD)	IIBCA	589	Mannose	(Sun et Altenbuchner, 2010)
Classe mannose				
LevD, LevE, LevF, LevG	IIA, IIB, IIC, IID	146,163 269,275	Fructose, mannose	(Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1990)

II.2.1. Le rôle de la phosphorylation de HPr dans la répression catabolique

La protéine HPr du PTS joue un rôle central dans la répression catabolique chez les firmicutes (Deutscher et al. 2006 ; Stülke et Hillen, 2000). Chez ces bactéries, en cas d'accumulation de fructose-1,6-diphosphate au niveau de la glycolyse, la protéine HPr, outre sa phosphorylation transitoire sur son résidu histidine 15 via la cascade du PTS, peut également être phosphorylée sur son résidu sérine 46 *via* la protéine bifonctionnelle HPr kinase/ phosphorylase (HprK/P) (Deutscher et Saier, 1983; Galinier *et al.*, 1998) dont les activités antagonistes sont modulées par des intermédiaires de la glycolyse (Kravanja *et al.*, 1999 ; Deutscher et Engelmann, 1984)

En fonction de l'état énergétique de la cellule (niveau d'ATP, de phosphate inorganique) et des conditions de croissance, la protéine HPr peut exister sous quatre formes: HPr libre non phosphorylée, P~His-HPr, P-Ser46-HPr et (P~His,P-Ser)-HPr (Vadeboncoeur *et al.*, 1991). Dans *B.subtilis*, le paralogue de l'HPr, la protéine Crh est aussi un substrat de l'HPr Kinase/phosphatase et la P-Ser46-Crh joue aussi un rôle dans la répression catabolique, mais exerce probablement des fonctions supplémentaires (Galinier *et al.*, 1997).

L'HPr kinase/phosphorylase est le deuxième élément clé dans la RC chez les bactéries à Gram positif. La première purification de cette enzyme bifonctionnelle date de 1984 (Deutscher et Engelmann, 1984). Depuis, l'HPr kinase/phosphorylase est étudiée en détail chez *B. subtilis* (Jault *et al.*, 2000; Reizer *et al.*, 1998), *Streptococcus salivarius* (Brochu et Vadeboncoeur, 1999), *Enterococcus faecalis* (Kravanja *et al.*, 1999) *Lactobacillus casei* (Dossounet *et al.*, 2000) et *Staphylococcus xylosus* (Huynh *et al.*, 2000) .

La phosphorylation de l'HPr par l'HprK/P nécessite la présence d'ions bivalents alors que l'EDTA l'inhibe (Deutscher *et al.*, 2006). Les intermédiaires de la glycolyse, comme le fructose-1,6-biphosphate (Deutscher et Engelmann, 1984) ou le glycérate-2-phosphate (Jault *et al.*, 2000) stimulent l'activité kinase de l'HprK/P de plusieurs organismes. En revanche, l'HPr kinase d'*E. faecalis* et *S. salivarius* est insensible au fructose -1,6- bisphosphate ou d'autres intermédiaires glycolytiques mais activée par l'ATP (Brochu et Vadeboncoeur, 1999 ; Kravanja *et al.*, 1999). Le phosphate inorganique est un autre effecteur de l'HprK/P, qui joue un double rôle : il inhibe l'activité kinase (Deutscher et Engelmann, 1984; Galinier *et al.*, 1998) et il est un substrat pour la déphosphorylation de la P-Ser-HPr. En effet, la déphosphorylation de la P-Ser-HPr suit un mécanisme de phosphorolyse et pas d'hydrolyse.

HprK/P est donc une phosphorylase, qui transforme P-Ser-HPr et Pi en HPr et pyrophosphate (Mijakovic *et al.*, 2002). L'activité phosphorylase nécessite aussi des ions bivalents et elle est inhibée par l'ATP.

La structure de l'HprK/P de *L. casei* (Fieulaine *et al.*, 2001), *S. xylosus* (Marquez *et al.*, 2002) et *Mycoplasma pneumoniae* (Allen *et al.*, 2003) a été déterminée ainsi que les structures de l'HprK/P de *L. casei* en complexe avec ses deux substrats protéiques, HPr et P-Ser-HPr, correspondant à ses deux activités kinase et phosphorylase (Fieulaine *et al.*, 2002). La présence de la HprK/P chez des nombreuses bactéries à Gram (-) non entériques comme les neisseriae, xanthomonades, rhodobactéries, burkholderiae, spirochètes, etc. (Boël *et al.*, 2003; Stülke et Hillen, 2000; Fraser *et al.*, 1998) laisse supposer un rôle régulateur de cette enzyme dans ces bactéries. La plupart de ces bactéries possède un PTS incomplet manquant les protéines transporteurs EIIC. Le rôle de ce PTS ainsi que de l'HprK/P a été peu étudié. Chez *Neisseria meningitidis* l'inactivation de la HprK/P diminue l'adhésion cellulaire (Boël *et al.*, 2003) et chez *Sinorhizobium meliloti*, il a été montré que la délétion du gène *hprK* affectait la croissance de la bactérie, la production de succinoglycane ainsi que la capacité à établir une symbiose avec l'hôte (Pinedo et Gage, 2009).

Pour les gènes soumis à une activation catabolique, comme *pta* de *B. subtilis*, le site *cre* est situé en amont du promoteur (Presecan-Siedel *et al.*, 1999). L'interaction entre CcpA et les sites *cre* s'effectue en présence d'un co-répresseur, la protéine P-Ser46-HPr. (Deutscher *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997) (Figure 4).

La partie N-terminale de CcpA renferme un motif hélice-tour-hélice spécifique des protéines se liant à l'ADN, tandis que la partie C-terminale renferme le domaine de fixation de son co-répresseur (Jones *et al.*, 1997), la P-Ser46-HPr et/ou P-Ser46-Crh (Saier *et al.*, 1996; Stülke *et al.*, 1997).

L'augmentation de la concentration du fructose-1,6-diphosphate en présence d'un sucre rapidement métabolisable a un double effet sur la répression catabolique: elle augmente l'activité kinase de la HprK/P et par conséquent le montant de P-Ser46-HPr (Monedero *et al.*, 2001b) et elle augmente l'affinité de la CcpA pour son co-répresseur P-Ser-HPr (Deutscher *et al.*, 1995) En effet, il a été démontré que l'interaction entre CcpA et de P-Ser-HPr est directement stabilisée par le fructose-1,6-diphosphate et le glucose-6-phosphate, permettant une régulation fine du contrôle de l'expression des gènes par CcpA en réponse à l'activité métabolique (Schumacher *et al.*, 2007; Deutscher *et al.*, 1995).

La répression catabolique médiée par CcpA a été aussi démontré chez *S. xylosus* (Egeter et Brückner, 1996), *Lactobacillus pentosus* (Mahr *et al.*, 2000) ; *L. casei* (Monedero *et al.*, 1997) ; *S. mutants* (Simpson et Russell, 1998) ; *L. monocytogenes* (Behari et Youngman, 1998) et *E. faecalis* (Leboeuf *et al.*, 2000), indiquant un rôle général de CcpA/P-Ser46-HPr dans la RC des firmicutes .

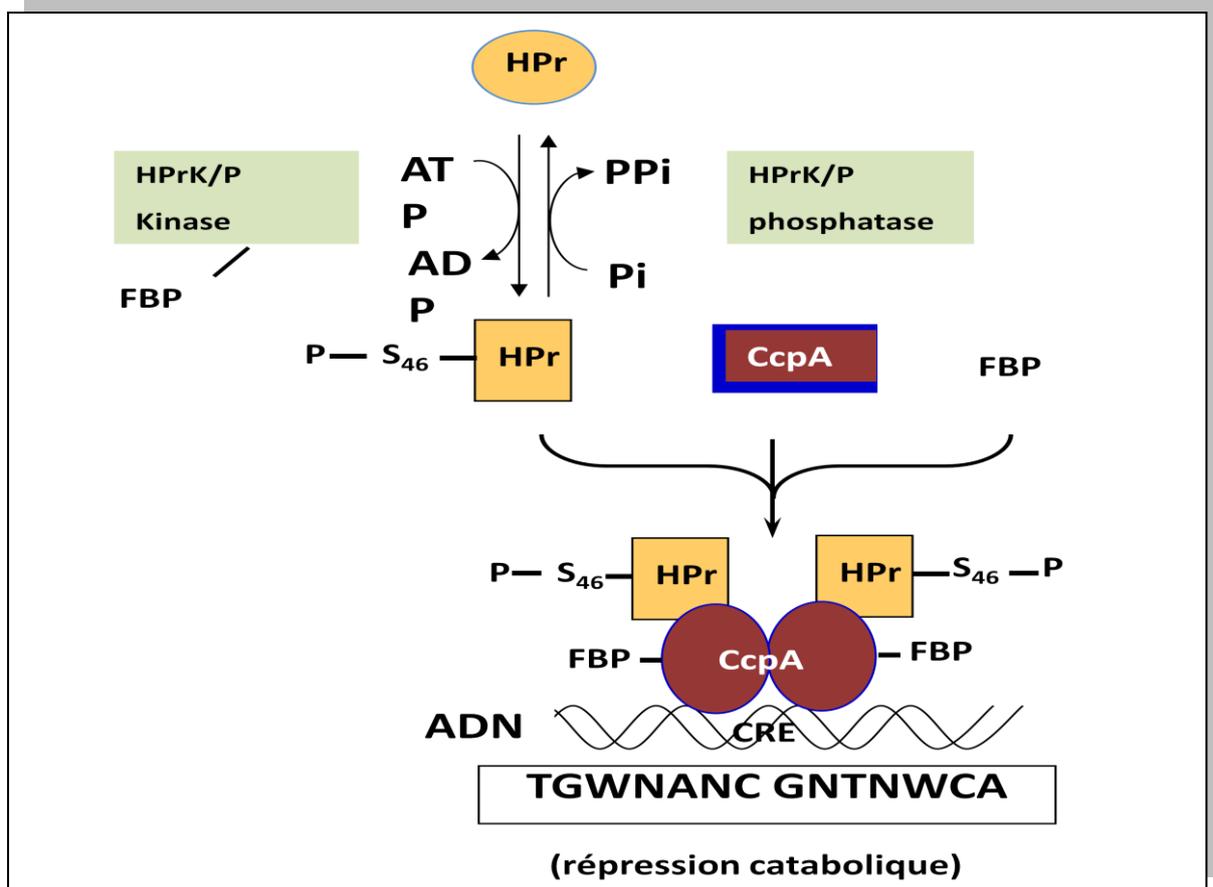


Figure 4 : Le mécanisme de la répression catabolique CcpA dépendant chez les firmicutes (Saier *et al.*, 1995)

II.2.3. Exclusion d'inducteur

La présence de sucre transporté par le PTS inhibe l'activité de transporteurs de sucres non PTS ainsi que l'entrée ou la production intracellulaire de l'inducteur correspondant conduisant ainsi à l'absence d'activation de l'expression des gènes sous contrôle de ces inducteurs (Deutscher *et al.*, 2006). C'est le mécanisme d'exclusion d'inducteur. Ce mécanisme diffère chez les firmicutes et les entérobactéries et ; chez ces derniers, l'exclusion d'inducteur est le mécanisme principal de la répression catabolique.

En présence de glucose, la protéine EIIA^{Glc} de *E. coli* se trouve majoritairement sous forme déphosphorylée puisqu'elle transfère son groupement phosphate au sucre entrant (Hogema *et al.*, 1998). EIIA^{Glc} déphosphorylée se fixe aux perméases à sucres non-PTS comme les perméase spécifiques au transport du lactose (LacY) (Osumi et Saier, 1982), du maltose (MalK) (Dean *et al.*, 1990) et du raffinose (RafB) (Titgemeyer *et al.*, 1994) et inhibe l'activité de transport de ces perméases en bloquant l'entrée de leurs substrats ou en inhibant

le métabolisme de ces sucres aboutissant à une assimilation préférentielle des sucres rapidement métabolisable, comme le glucose (Saier et Crasnier, 1996).

Chez les bactéries à Gram positif, le mécanisme d'exclusion de l'inducteur est médié par la P-Ser-HPr. L'implication de la P-Ser-HPr dans ce mécanisme a été vérifiée par des études *in vivo* pour le système de transport du maltose chez *L. casei* (Viana *et al.*, 2000; Monedero *et al.*, 2008), et pour les systèmes de transport du maltose et du ribose chez *L. lactis* (Monedero *et al.*, 2001a).

Chez *Lactobacillus brevis*, la protéine mutée HPr-Ser46Asp de *B. subtilis* qui probablement mime la P-Ser-HPr (Wittekind *et al.*, 1989) peut interagir avec la perméase du lactose et du glucose aboutissant à une inhibition du transport de ces sucres en découplant leur symport avec un proton changeant ainsi les symporteurs en facilitateurs de diffusion (Ye *et al.*, 1994; Ye et Saier, 1995).

Ce mécanisme médié par la P-Ser-HPr n'est pas unique. L'activité de la lactose perméase LacS de *Streptococcus thermophilus* est inhibée par la phosphorylation sur son domaine hydrophile C terminal qui est un homologue au domaine EIIA^{Glc} (Gunnewijk et Poolman, 2000).

Bien que le mécanisme de l'exclusion d'inducteur soit supposé exister chez *B. subtilis*, il n'existe pas d'exemple connu de cette régulation chez cette bactérie.

II. 2. 4. Les protéines à domaines PRD

Certains opérons du catabolisme des carbohydrates sont contrôlés par des régulateurs contenant des domaines PRD (PTS Regulation Domain), qui sont activés en présence de leurs inducteurs respectifs mais inactivés en son absence ou en présence de carbohydrates plus préférés. Ces PRDs renferment des histidines conservées qui sont des sites de phosphorylations PTS dépendantes. Ces phosphorylations modulent l'activité de ces régulateurs. Les protéines à domaines PRD sont classées en deux familles, les antiterminateurs et les activateurs transcriptionnels. (Stülke *et al.*, 1998).

II. 2. 4. 1. Les antiterminateurs à domaines PRD

B. subtilis contient quatre antiterminateurs homologues aux protéines de la famille BglG/SacY. Ces protéines, SacY, SacT, LicT et GlcT, contrôlent positivement les gènes impliqués dans le métabolisme des hydrates de carbones correspondants: SacY et SacT sont

impliquées dans le métabolisme du sucrose, LicT dans le métabolisme des oligo- β -glucosides et les aryl- β -glucosides, et finalement le GlcT dans l'assimilation du glucose.

SacY et SacT sont les antiterminateurs des opérons *sacB* (code pour une levansucrase)-*levB* (endolevanase)-*yveA*, *sacX* (IIBC^{SacX})-*sacY*, et *sacP* (IIBC^{SacP})-*sacA* (sucrose-6-P hydrolase)-*ywdA* (Tortosa et Le Coq, 1995) (Crutz *et al.*, 1990). LicT est un antiterminateur du gène *licS* (endo β -glucanase) et de l'opéron *bglP* (IIBCA^{Bgl})-*bglH* (6-P- β - glucosidase)-*yxiE*. (Schnetz *et al.*, 1996). GlcT c'est celui de l'opéron *ptsG* (IICBA^{Glc})-*ptsH* (HPr)-*ptsI* (EI) (Stülke *et al.*, 1997).

Ces antiterminateurs consistent en domaine N-terminal de fixation d'ARN suivi de deux PRDs (PRDI et PRDII). LicT de *B. subtilis* contient quatre histidines conservés dont trois sont phosphorylés par P~His-HPr (His-159 dans PRDI et His-207 et His-269 dans PRDII) tandis que le His-100 dans le PRDI est phosphorylé par le P~EIIB^{Bgl} (Lindner *et al.*, 1999). Des expériences génétiques ont montré que la phosphorylation sur His-207 et/ou His-269 par P~His-HPr stimule l'activité de LicT tandis que la phosphorylation sur His-100 par le P~EIIB^{Bgl} inhibe l'antiterminateur. La phosphorylation sur His-159 a seulement un faible effet sur l'activité de LicT (Tortosa *et al.*, 2001a). La présence d'un β -glucoside empêche la phosphorylation du His-100 par le P~EIIB^{Bgl}, parce que cette protéine transfère son groupement phosphate principalement aux substrats liés à l'EIIC^{Bgl}; par conséquent, l'absence de la phosphorylation sur His-100 conduit à l'induction de l'opéron *bglPH-yxiE*.

Plus généralement, en présence d'un sucre PTS qui active son antiterminateur, ce dernier se lie à un motif conservé « Ribonucleotidic antiterminateurs targets » (RAT). Cela empêche la formation du terminateur et ainsi la fin précoce de la transcription du gène ou de l'opéron (Krüger *et al.*, 1996). En revanche en présence d'une source de carbone rapidement métabolisable comme le glucose il y a peu de P~His-HPr dans la cellule (Monedero *et al.*, 2001b) et par conséquent les histidines dans le PRDII ne sont pas phosphorylés et l'antiterminateur reste inactive. L'absence de la phosphorylation sur les histidine du PRDII représente un mécanisme de la répression catabolique CcpA-indépendente (Lindner *et al.*, 2002). Ce principe de régulation des antiterminateurs par double phosphorylation par P~His-HPr et P~EIIB semble être valable pour la plupart des antiterminateurs avec PRD (Stülke et Hillen, 2000; Chen *et al.*, 2000; Deutscher *et al.*, 2006). Une exception est GlcT de *B. subtilis*, qui contrôle l'expression du gène *ptsG* codant pour la PTS perméase du glucose. L'activité de GlcT ne nécessite pas la phosphorylation par P~His-HPr et l'expression de *ptsG* n'est pas soumis à la RC.

II. 2. 4. 2. Les activateurs transcriptionnels

La régulation de l'expression génétique via le PTS peut mener aussi à l'activation de la transcription. Les activateurs transcriptionnels sont séparés en fonction du facteur sigma avec lequel ils agissent en deux groupes. Le premier rassemble les activateurs de la classes NifA/NtrC qui régule l'expression des gènes via le facteur de transcription σ^{54} , le second renferme les activateurs σ^{70} -dépendent.

A. La classe NifA/NtrC

Le membre de cette famille le plus étudié chez *Bacillus subtilis* est l'activateur LevR qui contrôle l'expression de l'opéron levanase (Débarbouillé *et al.*, 1991). Les protéines codées par cet opéron sont impliqués dans l'utilisation des polymères de fructose tel que les lévanes, qui sont dégradés en fructose par la levanase SacC, enzyme codée par le dernier gène de cet opéron. Le fructose est transporté par un PTS de la famille fructose/mannose composé de quatre protéines : LevD, LevE, LevF et LevG (Martin-Verstraete *et al.*, 1990). Le gène *levR* qui code pour le régulateur est localisé en amont de l'opéron. (Débarbouillé *et al.*, 1991).

La protéine LevR est composée d'un domaine hélice-tour-hélice N-terminal et d'un domaine central similaire au domaine central de NifA et NtrC, qui interagit avec le facteur σ^{54} et qui renferme les motifs A et B de Walker permettant la fixation et l'hydrolyse d'ATP. Le domaine central est suivi d'un PRD complet et un PRD tronqué situé à l'extrémité C-terminale de LevR. Entre les deux se trouvent un domaine EIIA^{Man}-like et un domaine EIIB^{Gat}-like (Deutscher *et al.*, 2006). L'activité de LevR est dépendante de son état de phosphorylation. LevR contient 5 sites de phosphorylation par le PTS, deux dans PRDI, un dans PRDII tronqué et un dans chacun des deux domaines EIIA^{Man}-like et EIIB^{Gat}-like (Figure 5).

LevR peut être phosphorylé sur l'His-585 du domaine EIIA par EI et HPr. Cette phosphorylation active le régulateur LevR. Mais LevR est également phosphorylé sur l'histidine du PRDII par la P~EIIB^{Lev}. Cette phosphorylation rend LevR inactif même si la protéine est phosphorylée sur son domaine EIIA (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). La phosphorylation du domaine EIIA est empêchée en présence d'un sucre PTS rapidement métabolisable et sert de mécanisme de répression catabolique CcpA-indépendante. L'absence de la seconde phosphorylation de LevR sur PRDII en présence de lévane ou fructose permet l'induction de l'opéron *lev*.

L'importance des différents composants du PTS sur la régulation de l'opéron *lev* a été mise en avant par l'étude des mutants *levD*, *levE*, *ptsH* et *ptsI*. L'inactivation de $EIIA^{lev}$ et $EIIB^{lev}$ engendre une forte activité constitutive de LevR. L'expression de l'opéron *lev* est constitutive aussi dans les mutants où *ptsI* et *ptsH* sont inactivés, mais cette expression est moins forte que celle observée dans les mutants *levD* et *levE*. (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Martin-Verstraete *et al.*, 1990).

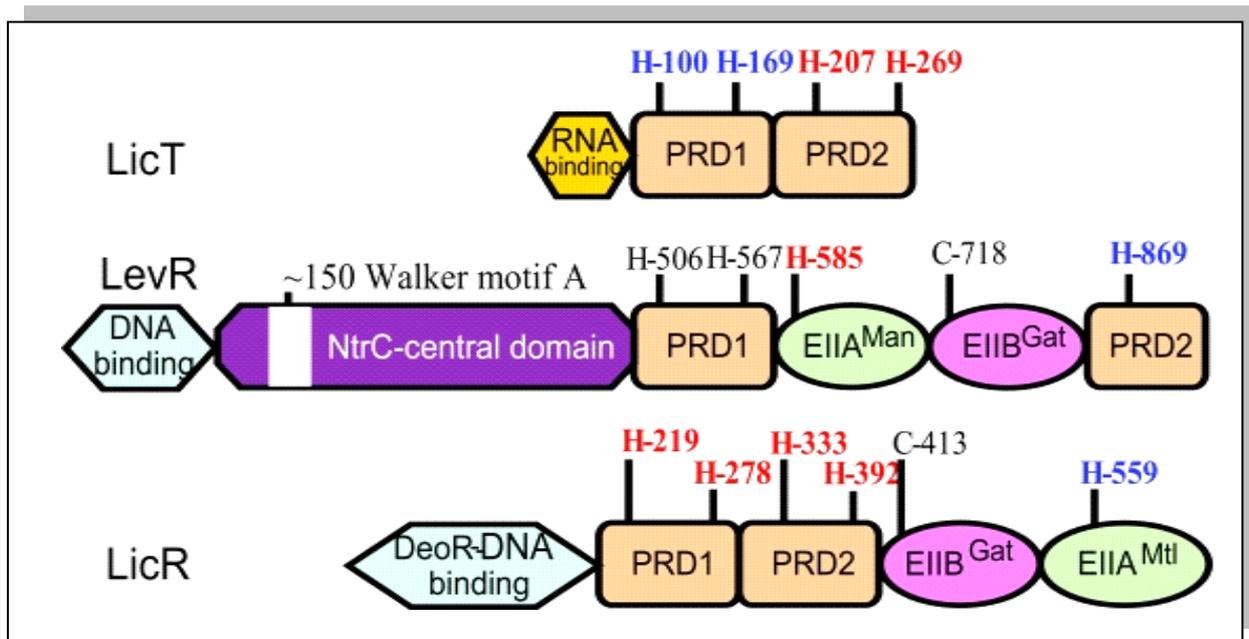


Figure 5: Structure des domaines de l'antitermineur LicT et des activateurs transcriptionnels LevR et LicR chez *B. subtilis*.

En rouge : sites de phosphorylation à effet positif sur l'activité du régulateur, en bleu : sites de phosphorylation à effet négatif sur l'activité du régulateur.

B. Les activateurs de la famille DeoR-like

La deuxième famille des activateurs transcriptionnels avec PRD est plus large que la famille NifA/NtrC-like. Ses membres interagissent avec le facteur σ^{70} et ils contiennent un motif HTH qui ressemble au HTH du répresseur DeoR d'*E. coli*. Chez les firmicutes le premier membre de cette famille fut découvert chez *Geobacillus stearothermophilus*. C'est le régulateur MtlR (Henstra *et al.*, 1996). Le deuxième régulateur fut découvert chez *B. subtilis* peu de temps après, LicR qui régule l'expression de l'opéron *licRBCAH* codant une β -glucosidase et un PTS de la classe lactose transportant des β -glucosides (Tobisch *et al.*,

1997). Par la suite des nombreuses autres protéines homologues à ces deux activateurs furent découvertes dans d'autres bactéries.

Les activateurs de la famille DeoR-like possèdent un domaine N-terminal de fixation à l'ADN suivi de deux PRDs, d'un domaine homologue aux EIIB^{Gat}, puis un domaine homologue aux EIIA^{Mtl} ou EIIA^{Fru}. La conservation des sites de phosphorylation au sein de ces différents domaines suggère que l'état de phosphorylation des différents domaines régule l'activité des activateurs.

Il a pu être montré que la mutation d'une des 4 histidines conservées dans les PRDs de LicR rend l'activateur inactif. Ces histidines sont phosphorylés par la P~His-HPr, ce qui active LicR. L'absence de ces phosphorylations aurait un rôle de répression catabolique CcpA-indépendant. Le domaine EIIA-like de MtlR et de LicR peut être phosphorylé en présence de PEP, EI, HPr, et des domaines/protéines EIIA et EIIB du PTS qu'ils régulent.

Une exception est l'activateur ManR de *L. monocytogenes*, qui contrôle l'expression de l'opéron *manLMN* qui code pour le PTS mannose/glucose principal chez cette bactérie. L'activité de cet opéron est contrôlée via la phosphorylation par les protéines MpoA (EIIA^{Mpo}) et MpoB (EIIB^{Mpo}) d'un autre PTS pour mannose/glucose (Aké *et al.*, 2011). Cette phosphorylation rend l'activateur inactif et l'absence de la phosphorylation sur le domaine EIIA de ManR servirait donc de signal pour indiquer la présence de l'inducteur dans le milieu. Cette phosphorylation a une action similaire à la phosphorylation sur le PRDI des antiterminateurs.

III. Le catabolisme du mannitol chez les bactéries

Le D-mannitol, l'hexitol l'omni présent dans la nature peut servir comme source de carbone pour un grand nombre de bactéries; souvent il entre dans la cellule par le système PTS, qui le phosphoryle au même temps. Le mannitol-1- phosphate résultant est oxydé par une déshydrogénase spécifique en présence de NAD en fructose-6-phosphate qui rejoint les voies générales du métabolisme.

Certaines organismes comme *Pseudomonas fluorescences* (Brunker *et al.*, 1998) et *Corynebacterium glutamicum* (Peng *et al.*, 2011) transportent le mannitol via un système ABC transporteur et contiennent une enzyme mannitol-2-déshydrogénase qui oxyde le mannitol et non pas le mannitol-1- phosphate.

Les études sur l'utilisation du mannitol chez différentes bactéries à Gram positif et à Gram négatif suggèrent des similarités fonctionnelles malgré les différences d'organisations des gènes composant les différents opérons mannitol.

Les gènes de l'opéron mannitol codant les enzymes EIICB^{Mtl} (ou EIICBA^{Mtl}), EIIA^{Mtl}, mannitol-1-phosphate déshydrogénase et le régulateur sont désignés respectivement par *mtlA*, *mtlF*, *mtlD*, et *mtlR*.

Chez les bactéries à Gram négatif le gène *mtlA* code pour une EIICBA^{Mtl} et est suivi par *mtlD* et *mtlR* (Lee et Saier, 1983). Chez les bactéries à Gram positif, les composants EIICB^{Mtl} et EIIA^{Mtl} sont deux protéines distinctes codées par des gènes séparées, *mtlA* et *mtlF*. (Reizer *et al.*, 1992).

En se basant sur la taille des protéines et le motif de liaison NAD, trois familles des déshydrogénases sont déterminées: a) à chaînes courtes : le motif NAD binding GxxxGxG proche du N-terminus, b) moyennes chaînes avec 350 résidus et le motif de liaison est GxGxGxxG, et c) à longue chaîne ≥ 450 résidus avec une variable séquence du motif.

Chez les bactéries à Gram négatif bien que l'opéron mannitol soit impliqué dans le transport et le métabolisme du mannitol, la protéine MtlR est très différente en séquence et en fonction du MtlR, le régulateur de l'opéron mannitol chez les bactéries à Gram positif.

Chez *E. coli*, l'organisme modèle des bactéries à Gram négatif et dont le transport du mannitol est PTS dépendant l'opéron mannitol a été le premier à être bien exploré. L'enzyme mannitol-1-phosphate déshydrogénase a été étudiée même avant la mise en évidence du mécanisme du transport par le PTS (Wolff et Kaplan, 1956).

La première caractérisation de l'opéron mannitol organisé en *mtlADR* remonte aux travaux de Lengeler (Lengeler, 1975a ; Lengeler, 1975b). Le gène *mtlA* de *E. coli* est le premier gène séquencé codant pour une enzyme II du PTS (Lee et Saier, 1983). Cette protéine comprend deux domaines hydrophiles, EIIA^{Mtl} et EIIB^{Mtl}. Le domaine membranaire EIIC^{Mtl} avec 346 acides aminés est formé de six segments transmembranaires qui sont liés par trois petites boucles transmembranaires et deux boucles intracellulaires larges (Lengeler *et al.*, 1994; Sugiyama *et al.*, 1991). Ces trois domaines sont fusionnés en un grand peptide de 637 acides aminés, qui forme des dimères (Boer *et al.*, 1994). *In vivo*, la protéine EIIA^{Mtl} séparée du complexe EIICB^{Mtl} est active et peut transférer son phosphate à EIIB^{Mtl} séparée ou fusionnée à EIIC^{Mtl} (van Weeghel *et al.*, 1991a). EIIA^{Mtl} reçoit le groupement phosphate de

P~His-HPr sur l'His 554 (van Weeghel *et al.*, 1991b) et le transfert sur le site Cys 384 dans EIIB^{Mtl} qui par la suite intervient dans la phosphorylation du mannitol.

L'implication d'une cystéine comme site de phosphorylation d'une protéine était reportée pour la première fois par les travaux de Pas et Robillard et cela dans la protéine EIIB de l'opéron mannitol de *E.coli* (Pas et Robillard, 1988).

L'étude d'interaction entre HPr et EIIA^{Mtl} réalisée par Nuclear Magnetic Resonance (NMR) montre sur HPr une surface de liaison convexe composée de deux segments de polypeptides incluant deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Cette surface interagit avec une région concave complémentaire sur EIIA^{Mtl} formée d'une hélice $\alpha 3$, la fin C-terminal de l'hélice $\alpha 2$ et un feuillet antiparallèle β (Figure 6-A). La majorité des interactions entre ces deux surfaces sont hydrophobes. Chez les bactéries à Gram (-) les résidus interfaciaux sont bien conservés et même quelques substitutions permettront toujours l'interaction hydrophobe entre EIIA^{Mtl} et HPr. Si on compare les séquences de l'interface de ces deux protéines chez les bactéries à Gram (+) à celle de *E. coli* le degré de la conservation est moindre: 28% chez *B.anthraxis*, 42% chez *B.subtilis*, et 41% chez *S. carnosus*, 42% (Cornilescu *et al.*, 2002). (Figure 6-B). Ainsi le transfert de groupement phosphate hétérologue de l'HPr de *E.coli* à l'EIIA^{Mtl} de *Staphylococcus carnosus* est dix fois moins vite que le transfert homologue entre les protéines de *S. carnosus* (Fischer et Hengstenberg, 1992).

Dans MtlA les domaines EIIA^{Mtl} et EIIB^{Mtl} sont liées par un linker flexible de 21 résidus. La surface d'interaction sur EIIA^{Mtl} composée de 27 résidus est formée de trois chaînes polypeptidiques. Une première chaîne de 19 résidus comprenant la fin de la partie C-terminal de l'hélice $\alpha 2$, un petit feuillet β et le site actif His 554, une deuxième chaîne comprend une boucle et la dernière l'hélice $\alpha 3$. Sur les 27 résidus, 23 sont aussi impliqués dans l'interaction avec HPr. Sur EIIB^{Mtl} la surface d'interaction de 18 résidus est répartie en 4 segments polypeptidiques (Suh *et al.*, 2006). Les résidus de la surface d'interaction sont très conservés entre les Gram(+) et les Gram (-) (Suh *et al.*, 2006).

Le gène *mtlR*, qui code pour une protéine de 195 résidus, situé en aval de l'opéron mannitol a été décrit pour la première fois par Figge et al. (Figge *et al.*, 1994). La délétion du gène *mtlR* augmente de 20 fois l'activité de MtlD et de MtlA mais ne supprime pas la répression catabolique sur l'expression de l'opéron mannitol (Figge *et al.*, 1994). L'activité constitutive des MIA et MtlD laisse à considérer MtlR comme le répresseur de l'opéron mannitol.

chez *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (Behrens *et al.*, 2001) et chez *B. subtilis* (Watanabe *et al.*, 2003; Heravi *et al.*, 2011; Joyet *et al.*, 2010).

Parmi les firmicutes, *Geobacillus stearothermophilus* est l'organisme où l'opéron mannitol est le mieux caractérisé grâce aux études de Henstra et ses collaborateurs (Henstra *et al.*, 1996). Il est composé des gènes *mtlARFD* et toutes les protéines codées par ces gènes ont été purifiées et leurs fonctions ont été confirmées (Henstra *et al.*, 1996).

MtlR de *G. stearothermophilus* est une protéine de 79 kDa contenant un domaine hélice-tour-hélice similaires aux régulateurs transcriptionnels de la famille DeoR qui est suivi par deux domaines PRD qui contiennent quatre sites potentiellement phosphorylables (H236, H295 dans le PRDI et H348 et H405 dans le PRDII).

Le site reconnu par MtlR a également été identifié chez *G. stearothermophilus* par les expériences de foot print. Il est constitué des 5 courtes régions qui s'étalent sur 50 bp en amont du promoteur (Henstra *et al.*, 1999). Des régions similaires sont trouvées chez des autres firmicutes. Chez *B. subtilis* l'opéron *mtlAFD* ainsi que le gène *mtlR* contiennent un site de fixation pour MtlR situé en amont du promoteur σ^A -dépendant. Les deux promoteurs sont soumis à la répression catabolique CcpA-dépendante (Heravi *et al.*, 2011).

Chez *G. stearothermophilus*, EIIB^{Mtl} phosphoryle MtlR sur une histidine dans le domaine EIIA^{Mtl}-like et HPr phosphoryle MtlR sur les histidines dans les PRDI et PRDII (Henstra *et al.*, 1999). Ces phosphorylations sont réversibles. La phosphorylation par HPr augmente l'affinité de MtlR à son site de liaison. Cette phosphorylation est diminuée en présence du glucose et l'absence de cette phosphorylation représente un mécanisme de la répression catabolique CcpA-indépendante. La présence d'un site *cre* en amont de l'opéron mannitol montre bien que chez la plupart des firmicutes cet opéron est aussi réprimé par un mécanisme CcpA-dépendant (Henstra *et al.*, 1999).

Comme chez *G. stearothermophilus*, l'opéron mannitol de tous les firmicutes étudiés est organisé en *mtlARFD*, sauf chez *B. subtilis*, où *mtlR* ne fait pas partie de l'opéron (*mtlAFD*), mais il est situé 14.4 kb en aval de *mtlD* (Kunst *et al.*, 1997). Il a été montré que son inactivation conduit à une perte de l'expression des gènes de l'opéron mannitol (Watanabe *et al.*, 2003), confirmant que c'est bien le régulateur de l'opéron *mtl*.

Dans la Figure 7 et le Tableau 4 sont présentés les différents gènes constituant l'opéron mannitol ainsi que les domaines et les sites de phosphorylation des composants du PTS mannitol chez plusieurs firmicutes ainsi que chez *E. coli*. Les sites de phosphorylation et

les acides aminés qui les entourent sont bien conservés, même chez *E. coli*. Le linker entre les domaines C et B est d'une longueur très variable, ce qui explique que la taille des MtlA et la position du site de phosphorylation dans le domaine EIIB^{Mtl} sont également variables.

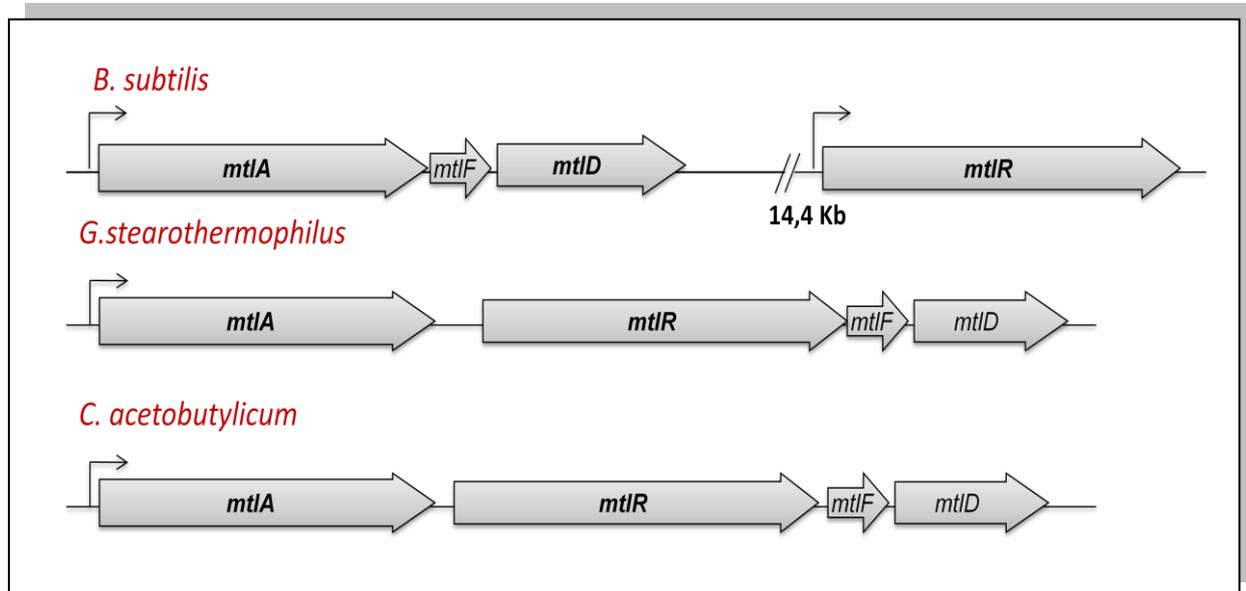


Figure 7: L'organisation de l'opéron mannitol chez certaines bactéries

La taille et la structure des domaines de MtlR de différents firmicutes sont également bien conservées (Figure 8). Cependant, les sites potentiels de phosphorylation sont peu conservés. A titre d'exemple, parmi les 6 sites potentiels de phosphorylation de *B. subtilis* ou *G. stearothermophilus*, seulement 2 sont conservés chez MtlR de *L. casei*. Même le Cys 419, site de phosphorylation par EIIB^{Mtl}, empêchant l'induction de l'opéron chez *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010), est remplacé par un thréonine chez *L. casei*. MtlR de *G. stearothermophilus* est phosphorylée sur les His dans PRDI (Henstra *et al.*, 2000). Ces histidins sont conservés chez MtlR de *B. subtilis*, mais ils ne sont pas phosphorylés dans des tests *in vitro* (Joyet *et al.*, 2010).

L'originalité de la régulation du MtlR de *B. subtilis* est liée à sa phosphorylation par l'EIIB^{Mtl} sur le Cys419. MtlR de *B. subtilis* représente le premier cas d'un activateur de transcription inhibé par phosphorylation du résidu cystéine dans le domaine EIIB^{Gat}. Cette variabilité confirme l'hypothèse que le mode de régulation des activateurs de transcription contenant des PRDs est peu conservé (Deutscher *et al.*, 2006).

Tableau 4 : Comparaison de la taille des MtlA (EIICB^{Mtl}), MtlF (EIIA^{Mtl}) et MtlR et leurs sites de phosphorylation chez plusieurs firmicutes et de MtlA (EIICBA^{Mtl}) de *E. coli*

Bactérie	MtlA (EIICB)		MtlF (EIIA)		MtlR	
	Taille	Sites de phosphorylation	Taille	Sites de phosphorylation	Taille	Sites de phosphorylation potentiels ^a
<i>B. subtilis</i>	478	Cys396	143	His 62	694	His230 His289 His342 His399 Cys419 His599
<i>G. stearothermophilus</i>	482	Cys398	147	His65	697	His236 His295 His348 His405 Cys423 His598
<i>S. carnosus</i>	515	Cys429 ^b	144	His 62 ^c	677	His231 His290 His341 His398 Cys417 His585
<i>E. faecalis</i> V583	590	Cys388	145	His62 ^d	677	His334 His392 His588
<i>S. mutans</i>	569	Cys369	145	His62	663	His226His284 His332 His391Cys411
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	481	Cys398	146	His62	684	His 288 His341 His 400 Cys 420 His591
<i>L. casei</i>	608	Cys399	148	His63	694	His349 His599
<i>E. coli</i>	637 (EIIC BA)	Cys 384 (EIICBA)	–	His554 (EIICBA)	–	–

^aLes sites de phosphorylation établis sont en gras. ^b(Pogge von Strandmann *et al.*, 1995); ^c(Fischer et Hengstenberg, 1992); ^d(Fischer *et al.*, 1991).

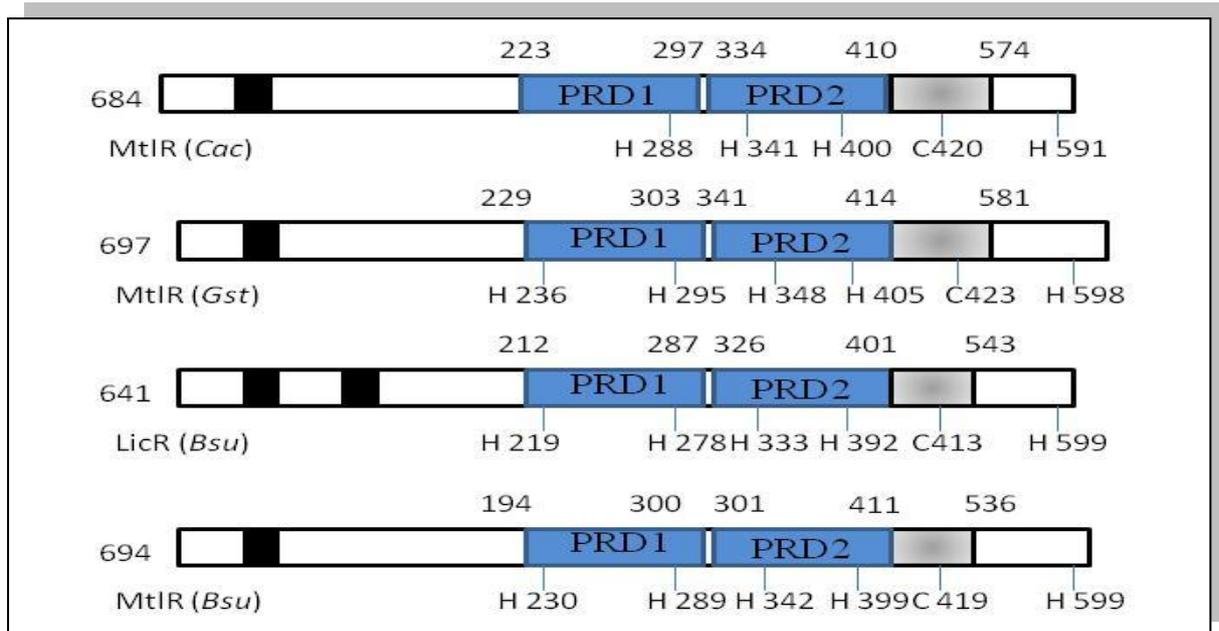


Figure 8 : Organisation de MtlR de quelques firmicutes et LicR de *Bacillus subtilis*.

MtlR (*Cac*): MtlR de *Clostridium acetobutylicum*; MtlR (*Gst*): MtlR de *Geobacillus stearothermophilus*; LicR (*Bsu*): LicR de *Bacillus subtilis*; MtlR (*Bsu*): MtlR de *Bacillus subtilis*

Le travail présenté dans cette thèse a permis de mettre en évidence un nouveau mode de régulation des activateurs de transcription à PRD, qui n'est pas lié à la phosphorylation par les composants du PTS, mais à l'interaction avec une protéine du PTS. L'interaction de l'EIIB^{Mtl} avec MtlR s'est avérée essentielle pour l'activité du régulateur transcriptionnel.

Matériel et Méthodes

I. Souches et cultures

I.1. Souches bactériennes

La souche sauvage *Bacillus subtilis* utilisée dans ce travail est une dérivée de la souche 168 dite de « Marburg », prototrophe au tryptophane, la BSB168. Les clonages ont été réalisées dans les souches d'*Escherichia coli* NM522 (Gough et Murray, 1983).

Les souches de *B. subtilis* et de *E. coli* utilisées et construites au cours de ce travail sont répertoriées dans le Tableau 5.

Tableau 5: Les souches utilisées dans cette étude

Souches	Structure ou génotype	Source,
<i>E. coli</i> NM522	<i>supE thi-1Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)</i> (<i>r_k⁻ m_k⁻</i>)[F' <i>proAB lacI^qZΔGM15</i>]	(Gough et Murray, 1983)
<i>E. coli</i> pDG1664EIBwt	<i>B. sub thrC 3'-mtlA</i>	Ce travail
<i>E. coli</i> pDG1664EIBAsp	<i>B. sub thrC 3'-mtlACys/Asp</i>	
<i>E. coli</i> pDG1664EIBAla	<i>B. sub thrC 3'-mtlACys/Ala</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	Souche de laboratoire
HB40	PJ001 tf avec pGEM-T (<i>3'-mtlA/ upstream-aphA3- mtlF</i> downstream), Kan ^r Cm ^r	Ce travail
HB41	PJ001 tf avec pGEM-T (<i>mtlF upstream-aphA3-mtlF</i> downstream), Kan ^r Cm ^r	Ce travail
HB42	PJ001 tf avec pGEM-T (<i>mtlA upstream-aphA3-mtlD</i> downstream), Kan ^r Cm ^r	Ce travail
HB47	HB40 tf avec pMADΔHindIII Δ <i>3'-mtlA</i>	Ce travail
HB 51	HB42 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 53	HB40 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB54	HB42 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> Cys-Ala, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB56	HB40 tf avec pDG1664EIB, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail

HB61	HB40 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB63	HB42 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB65	HB40 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlAC/D</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB66	HB40 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlAC/A</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB67	HB40 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlAC/D</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB68	HB42 tf avec pBQ200 ywqC3'- <i>mtlAC/A</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 69	HB42 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> Cys-Ala, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 70	HB40 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> Cys-Asp, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 71	HB40 tf avec pBQ200 Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 72	HB40 tf avec pBQ200 3'- <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 73	HB42 tf avec pBQ200, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 74	HB42 tf avec pBQ200 3'- <i>mtlA</i> , Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
HB 75	HB42 tf avec pDG1664 <i>mtlA</i> Cys-Asp, Kan ^r Cm ^r Erm ^r	Ce travail
PJ001	BSB168 tf avec pDG1661Pmtl-lacZ; <i>amyE:: (Cm-Pmtl-lacZ)</i>	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ002	PJ001 tf avec PCR du fragment ADN amplifié <i>mtlR</i> (Δ PRD1-PRD2-EIIB ^{Gat} -EIIA ^{Mtl});::spec	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ007	PJ002 tf avec pMAD Δ HindIII- <i>mtlRH342D</i> , Cm ^r Spec ^r Erm ^r	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ027	PJ004 tf avec pMAD Δ HindIII- <i>mtlR419A</i> , Cm ^r Spec ^r Erm ^r Kan ^r . (PJ004: PJ002 tf avec pGEM-T(<i>mtlF</i> upstream- <i>aphA3-mtlF</i> downstream))	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)

tf : transformé

Tableau 6: Liste des vecteurs construits et utilisés dans cette étude

Plasmides		Description	Références
pGEM-T(<i>mtlF</i> upstream- <i>aphA3</i> - <i>mtlF</i> downstream)		Délétion de <i>mtlF</i>	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
pGEM-T(3'- <i>mtlA</i> upstream- <i>aphA3</i> - <i>mtlF</i> downstream)		Délétion de 3'- <i>mtlA</i> Δ <i>mtlF</i>	Cette étude
pGEM-T(<i>mtlA</i> upstream- <i>aphA3</i> - <i>mtlD</i> downstream)		Délétion de <i>mtlAFD</i>	Cette étude
pMADΔHindIIIΔ3'- <i>mtlA</i> : (5' <i>mtlA</i> upstream- <i>mtlF</i> <i>mtlD</i> downstream)		Délétion de 3'- <i>mtlA</i>	Cette étude
pBQ200 <i>ywqC</i> /3'- <i>mtlA</i> pBQ200 <i>ywqC</i> /3'- <i>mtlAC</i> /D pBQ200 <i>ywqC</i> /3'- <i>mtlAC</i> /A pBQ200 3'- <i>mtlA</i>		Fusion <i>YwqCEIIB</i> ^{Mtl} Fusion <i>YwqCEIIB</i> ^{Mtl} <i>Cys</i> /Asp Fusion <i>YwqCEIIB</i> ^{Mtl} <i>Cys</i> /Ala <i>EIIB</i> ^{Mtl}	Cette étude
pQE30	MtlR	Matrice d'amplification	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
	EIIB EIIBAsp EIIBAla		Cette étude
pMADΔHindIII	- <i>mtlRC419D</i> - <i>mtlRH599D</i>	Matrice pour amplifier <i>mtlRC419D</i> et <i>mtlRH599D</i>	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
pGAD-C1	pGAD-C1-EIIB pGAD-C1-EIIB <i>Cys</i> /Asp pGAD-C1-EIIB <i>Cys</i> /Ala pGAD-C1- <i>mtlR</i> pGAD-C1-PRD1 pGAD-C1-PRD2 pGAD-C1-PRD1-PRD2 pGAD-C1-PRD2EIIB ^{Gat} pGAD-C1-EIIB ^{Gat} pGAD-C1-EIIA pGAD-C1-EIIB ^{Gat} EIIA pGAD-C1-EIIB ^{Gat} C419DEIIA pGAD-C1-EIIB ^{Gat} EIIAH599D pGAD-C1- EIIB ^{Gat} C419DEIIAH599D	Vecteurs utilisés dans la transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour le criblage double hybride	Cette étude

pGBDU-C1	pGBDU-C1-EIIB pGBDU-C1-EIIB cys/asp pGBDU-C1-EIIB cys/ala pGBDU-C1- <i>mtlR</i> pGBDU-C1-PRD1 pGBDU-C1-PRD2 pGBDU-C1-PRD1-PRD2 pGBDU-C1-PRD2EIIB ^{Gat} pGBDU-C1-EIIB ^{Gat} pGBDU-C1-EIIA pGBDU-C1-EIIB ^{Gat} EIIA pGBDU-C1-EIIB ^{Gat} C419DEIIA pGBDU-C1-EIIB ^{Gat} EIIAH599D pGBDU-C1- EIIB ^{Gat} C419DEIIAH599D	Vecteurs utilisés dans la transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour le criblage double hybride	Cette étude
pDG1664	pDGEIIB pDGEIIBAsp pDGEIIBAla	Vecteurs utilisés pour l'intégration ectopique des gènes codants pour les différents allèles EIIBwt, EIIBCys/Asp, EIIBCys/Ala	Cette étude
pDG1664	pDGMtIA pDGMtIAasp pDGMtIAala	Vecteurs utilisés pour l'intégration ectopique des gènes codants pour les différents allèles <i>mtlA</i> , <i>mtlACys/Asp</i> , <i>mtlACys/Ala</i>	Cette étude

I.3. Milieux de culture

Les cultures d'*E.coli* et de *B.subtilis* sont réalisées en milieu Luria Bertani (LB) (Bertani, 1951). Les milieux gélosés sont obtenus par ajout de 1.5% d'agar au milieu liquide. Les cultures des souches renfermant des plasmides sont réalisées en présence de l'antibiotique de sélection correspondant.

Les milieux utilisés pour la préparation de souches de *B. subtilis* compétentes sont MG1 et MG2 (Anagnostopoulos et Spizizen, 1961) (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition des milieux utilisés pour la transformation de *B.subtilis*

MG1	MG2	Milieu minimum
Milieu minimum 1X +	Milieu minimum 1X +	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O :.....14g/l
Glucos:.....5g/l	Glucose:..... 5g/l	Citrate de sodium trisodique :..... 1g/l
MgSO ₄ :..... 1.6 mM	MgSO ₄ :4 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄2g/l
Hydrolysats de caséine :.....0.25g/l	Hydrolysats de caséine :.....0.12g/l	KH ₂ PO ₄ : 6g/l
Extrait de levure :.....1g/l	Extrait de levure :.....0.25g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O:.....0.2g/l
Filtrer puis stocker à -20°C	Filtrer	Ajuster à pH7
	Ca(NO ₃) ₂ :.....2.5mM	
	Stocker à -20°C	

I.4. Conservation des souches

Les souches d'*E.coli* et de *B. subtilis* sont cryogénisées à -80°C à partir de cultures en phases stationnaire de croissance obtenues en LB additionnées de 20% de glycérol. La pression de sélection est maintenue si nécessaire. Les souches de *B. subtilis* sont également conservées sous forme sporulée.

II. Techniques de biologie moléculaire

II.1. Préparation de l'ADN génomique bactérien

▪ Principe

La première étape est la lyse des cellules avec du lysozyme, suivi d'une extraction par des détergents et une protéolyse avec la protéinase K, qui vont casser les membranes cellulaires et nucléaires et dénaturer les protéines. Ensuite on utilise généralement du phénol pour retirer les protéines et séparer l'ADN.

▪ **Technique**

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant le kit « GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit » (Sigma-Aldrich).

Dans 1.5 ml de milieu LB les bactéries sont cultivées pendant une nuit sous agitation à 37 °C. La culture est centrifugée 2 min à 13000 g, et le culot obtenu est utilisé selon les recommandations du fournisseur pour extraire l'ADN génomique.

Le kit GenElute se combine les avantages d'un système à base de silice avec des micro - colonnes en éliminant le besoin de résines chères, la précipitation d'alcool et des composés biologiques organiques dangereux comme le phénol et le chloroforme. Les bactéries sont lysées dans des agents chaotropiques pour assurer la dénaturation minutieuse des macromolécules.

II.2. Préparation des ADN plasmidiques

▪ **Principe**

Préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien par lyse alcaline.

Le principe repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique enroulé. La minipréparation commence par une lyse bactérienne, on se place en tampon alcalin en présence de SDS et de RNase. Le SDS solubilise les phospholipides et les protéines de la membrane cellulaire libérant ainsi le contenu de la bactérie. On ajoute ensuite une solution saline qui précipitera la plupart des composants cellulaires autre que le plasmide. Le plasmide récupéré est ensuite purifié sur une colonne d'affinité.

▪ **Technique**

Le kit « QIAprep Spin Miniprep » (Qiagen) est utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique. 4 ml d'une culture de 16-18 h dans du milieu LB supplémenté de l'antibiotique adéquat sont utilisés selon les recommandations du fournisseur pour récupérer spécifiquement l'ADN plasmidique.

II.3. Amplification par réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

▪ Principe

C'est une succession de réactions de réplification d'une matrice d'ADN mettant en œuvre deux amorces oligonucléotidiques qui reconnaissent les extrémités 3' de chaque brin du fragment à amplifier. L'amplification se fait par une réaction en chaîne qui consiste en la répétition d'un cycle triphasique : dénaturation de l'ADN à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une DNA polymérase en présence de dNTP.

▪ Technique

Différentes PCR sont utilisées dans ce travail, des PCR sur ADN et PCR sur colonies. En pratique, le mélange réactionnel de 50 µl final contient au maximum 1 µg d'ADN, 25 µM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce, du tampon et de la DNA polymérase. Les polymérases utilisées sont la Pfu, la Phusion ou la GoTaq. Les conditions expérimentales utilisées sont représentées dans le Tableau 8.

Nombre de cycle(s)	Température (°C)	Durée (min)
1	95	5
	95	0,5
30	53-57	0,5
	72	1/1Kb
1	72	5

Tableau 8: Programme des réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions des PCR sont réalisées à l'aide d'un thermocycler MasterCycler Gradient (Eppendorf). Les produits des PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

II.4. PCR trois voies

La mutagenèse dirigée par PCR 3 voies permet de fusionner deux fragments d'ADN préalablement amplifiés et se chevauchant sur 20 nucléotides ou plus (Figure 10).

Deux réactions de PCR sont d'abord effectuées en parallèle, la première PCR est réalisée avec deux oligonucléotides qui permettent d'amplifier la partie 5' de l'amplimère désiré, un des deux oligonucléotides permettant l'insertion d'un site de restriction. De même, les oligonucléotides utilisés pour la deuxième PCR permettent d'amplifier la partie 3' de l'amplimère désiré en introduisant un autre site de restriction à l'extrémité 3'. Les deux produits de PCR sont alors purifiés et utilisés comme matrice pour une troisième PCR en présence des deux amorces externes, l'amorce 5' du premier fragment et l'amorce 3' du deuxième fragment. La troisième PCR permet d'obtenir le fragment complet d'ADN. Le programme utilisé pour la dernière PCR nécessite une étape permettant l'hybridation des deux produits de PCR et est présenté dans le Tableau 9.

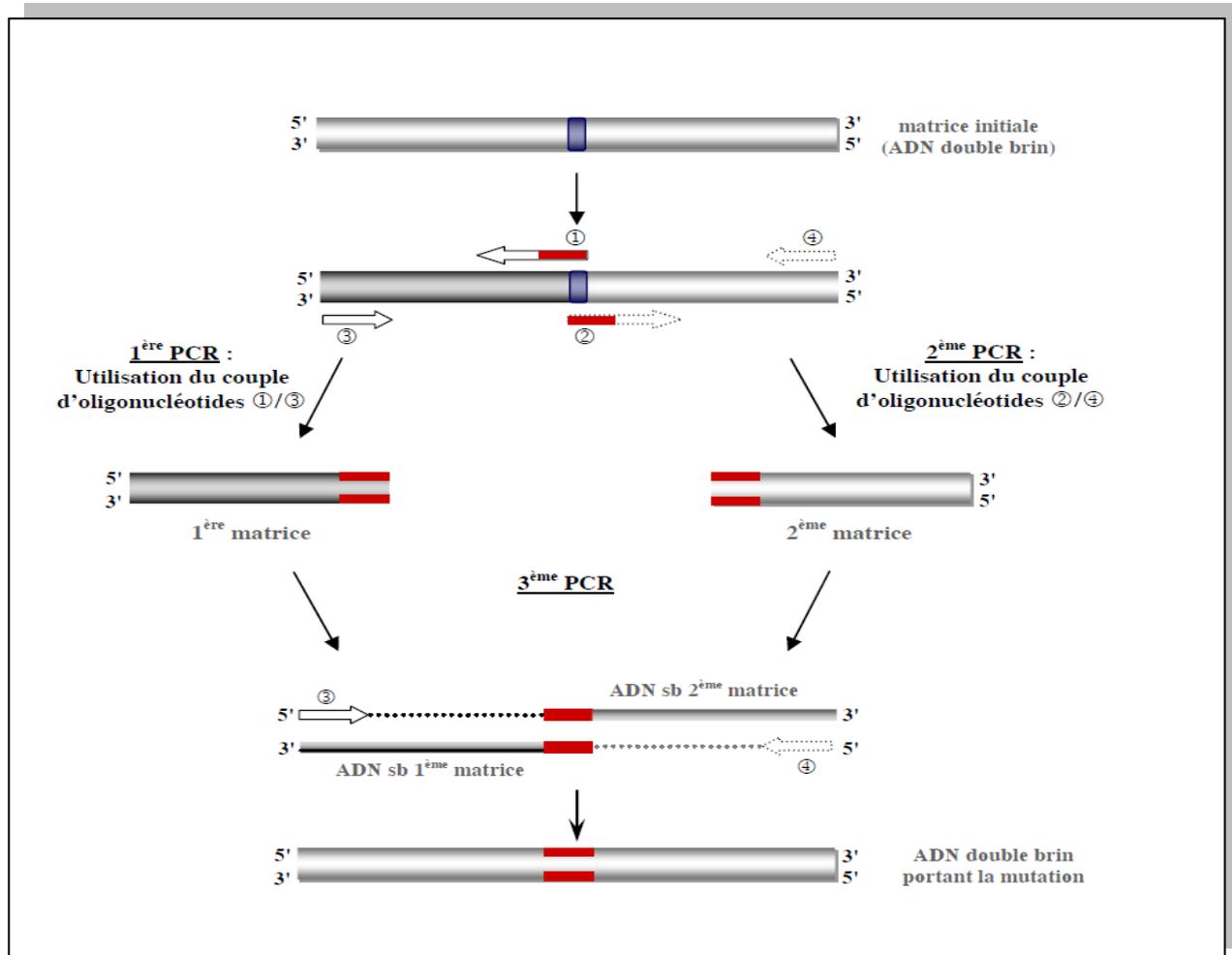


Figure 10 : Schéma de la PCR 3 voies

Tableau 9: Programme des réactions de la PCR 3 voies

Nombre de cycle(s)	Température (°C)	Durée (min)
1	90	1
	80	0.1
	60	2
	72	10
	90	1
	60	2
	72	3
30	90	0.5
	56	0.5
	72	5
1	72	5

II.5. Electrophorèse des fragments d'ADN

La qualité et la taille des produits de PCR, les ADN génomiques et plasmidique ainsi que les produits de digestion sont analysées par électrophorèse sur gel d'agarose. Un gel horizontal d'agarose est composé du tampon TAE 0.5X et d'agarose ajoutée en quantité appropriée au pourcentage du gel. Il est généralement compris entre 0.8% et 1.5%. Pour la visualisation de l'ADN sur gel, sous irradiation UV, du bromure d'éthidium (BET) à 0.5 mg/ml est ajouté. Avant d'être déposés dans les puits du gel les échantillons d'ADN sont additionnés du tampon de dépôt 5X (glycérol 50%, Bleu de bromophénol 0.25%). La vitesse de migration d'un fragment d'ADN dépend de sa masse, de sa conformation, de la concentration du gel en agarose et du courant appliquée.

Les Bandes d'ADN révélées avec le BET sont visualisées à l'aide d'un transilluminateur à une longueur d'onde de 302 nm.

II.6. Purification de l'ADN

Pour l'extraction des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose, après une électrophorèse, la bande d'ADN est repérée sur une table UV à 365 nm, et découpée. L'ADN est extrait du gel grâce à l'utilisation du kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Qiagen) ou « Wizard® SV

Gel and PCR Clean-Up System » (Promega). Ce dernier kit est aussi utilisé pour la purification des produits de PCR.

Le principe de cette extraction consiste à solubiliser le morceau de gel d'agarose contenant le fragment d'ADN d'intérêt et à le faire passer sur une colonne contenant une matrice de silice. Ce passage se réalise dans des conditions de salinité permettant l'adsorption de l'ADN sur la matrice. Des lavages successifs permettent ensuite d'éliminer les impuretés. L'ADN est finalement élué dans de l'eau ou dans un tampon de faible force ionique.

La taille et la quantité du fragment de l'ADN purifié sont estimées par comparaison avec la co-migration d'un marqueur de taille.

II.7. Restriction de fragments d'ADN

Chacune des enzymes de restriction (New England Biolabs) est utilisée avec un tampon qui lui confère une activité maximale. Des doubles digestions sont également effectuées selon les recommandations du fournisseur. La digestion est réalisée dans un volume final de 50 µl avec 10 unités de chaque enzyme pendant au moins 3 heures.

II.8. Ligature des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN (insert et vecteur) sont d'abord déposés sur un gel d'agarose pour estimer leurs quantités relatives. Une mesure de la concentration est aussi réalisée avec le Nanodrop « Nanodrop spectrophotometer ND-1000 Babtech- Paris, France ». Les deux fragments d'ADN, dans un rapport molaire insert/vecteur d'environ 6/1 sont ensuite ligaturés à 4°C toute la nuit.

Cette réaction est réalisée avec la « T4DNA ligase » (Invitrogen, Promega) suivant les indications du fournisseur.

II.9. Manipulation de l'ARN

II.9.1. Extraction de l'ARN

Ensemencer un milieu LB avec une culture de nuit à une dilution 1:100 jusqu'à $DO_{600} = 0.4-0.6$. L'extraction de l'ARN est réalisée selon le protocole du kit Qiagen « RNeasy mini Kit ».

Le culot de 50 ml de cette culture est récupéré après centrifugation à 7000 rpm durant 10 min dans 500 µl du tampon RLT (Qiagen) additionné de 5 µl de β mercaptoéthanol.

Une lyse cellulaire est ensuite réalisée avec des billes de verre de 200-300 μm (Sigma) à l'aide du Fast Prep®-24 MP (Qbiogene, California, USA) à 6,5 m/s 3 fois pendant 60 secondes à chaque fois. Les tubes sont gardés dans la glace 5 min après chaque lyse. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C à 13000 rpm durant 10 min. Le surnageant est récupéré doucement pour l'extraction de l'ARN. L'ARN est conservé à -80°C.

II.9.2. Traitement à la DNase de l'ARN

Ce traitement est réalisé avec le kit Ambio® « Turbo DNA Free ». Dans un volume final de 50 μl , 10 μg d'ARN, 5 μl du tampon 10X et 1 μl de la DNase sont incubés à 37°C pendant 20 min. Au bout de ce temps 1 μl de la DNase est ajouté au mix qui sera réincubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite 5 μl d'inhibiteur sont ajoutés au mélange. Ce dernier est laissé 2 min à température ambiante, puis centrifugé à 13000 rpm pendant 1 min. Le surnageant constitué de l'ARN traité est récupéré et stocké à -80°C.

Une aliquote de l'ARN avant et après traitement est prélevée pour un dosage réalisé au Nanodrop et une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2%.

II.9.3. Vérification par PCR de l'ARN traité

Une absence de l'ADN génomique dans les différents extraits d'ARN est confirmée par une PCR. La PCR est réalisée sur 1 μg d'ARN avec un couple d'amorces au choix. Un témoin positif est réalisé avec de l'ADN génomique de BSB168.

II.9.4. La Reverse Transcription (RT) de l'ARN

La réaction de reverse transcription est réalisée avec le kit Invitrogen « superscript III®, reverse transcriptase ». Le mélange réactionnel de 12 μl final contenant 1 μg d'ARN, 0.5 mM dNTPs et 500 ng d'hexamères est incubé 10 min à 70°C. Ensuite 4 μl du tampon 5X, 5 mM du DTT et 40 U/ μl d'inhibiteur de RNase (RNase out) sont ajoutés au mélange qui est incubé ensuite 2 min à 42°C. L'enzyme Superscript est ajoutée en dernier et le tout est incubé 2 h à 42°C. Après ce délai l'enzyme est inactivée par un chauffage à 70°C pendant 15 min. Les cDNA obtenus sont conservés à -20°C.

II.9.5. La PCR quantitative

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction au fil du temps. Des sondes fluorescentes se fixent soit sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon) ou sur l'ADN double brin (technologie SYBR). C'est cette dernière que nous avons exploré par l'utilisation du Kit Roche « LightCycler® FastStart DNA SYBER Green I ». La fluorescence est apportée par le fluorochrome SYBER Green I. Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN double brin généré. Les valeurs obtenues sont corrigées par rapport à un gène de référence. Effectuer une correction à partir d'un gène de référence permet d'éliminer les effets de fluctuations.

L'appareil de PCR quantitative utilisée est le « LightCycler 1.5 Roche » (Rotkreuz, Suisse) les amorces utilisées et le programme suivi sont rapportés respectivement dans les Tableaux 10 et 11.

Tableau 10 : Les amorces utilisées pour la qPCR

Nom de l'amorce	séquence
ForrpoB	TTTAAGCCGTATGGAGCG
RevrpoB	TCGTCTGATCCATGAATTGAGAAA
ForlacZ	TTGCATCGAGCTGGGTAATA
RevlacZ	GCTTCACTTACGCCAATGTC

Tableau 11: Programme utilisé pour la qPCR

Étapes	Nombre de cycles	Température °C	Durée (min)
Dénaturation	1	95	8
Amplification	45	95	0.16
		55	0.1
		72	0.16
Fusion	1	65-95	5

III. Techniques de transformation et de criblages des mutants

III.1. Transformation de bactéries compétentes

La transformation est une méthode simple pour introduire de l'ADN exogène dans des cellules diverses. Dans cette étude nous avons utilisé la transformation par électroporation. La décharge électrique dépolarise les membranes cellulaires et la bactérie compétente peut incorporer alors l'ADN exogène.

III.1.a. Préparation de bactéries électrocompétentes de *E. coli*

A partir d'une préculture réalisée sur la nuit, 500 ml de milieu LB sontensemencés au centième, puis incubés à 37°C, sous agitation. Lorsque la DO₆₀₀ atteint entre 0.4-0.6, la culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est repris délicatement et lavé dans 500 ml d'eau froide puis dans 200 ml de glycérol à 10% froid. Après chaque lavage la suspension est centrifugée à 5000 rpm durant 15 min à 4°C. Le culot est alors repris dans 2 ml de glycérol à 10% est aliquoté en fractions de 50 µl chacune puis congelées à -80 °C. Les conditions de stérilité habituelles sont respectées tout au long de la préparation.

III.1.b. Electroporation chez *E. coli*

A chaque 50 µl de cellules compétentes, 5 µl de la mixture de ligature ou 0.5 µl de préparation plasmidique est ajoutée. Le mélange est transféré dans des cuves d'électroporation froide. Afin de permettre l'adsorption de l'ADN sur les cellules ces cuves sont maintenues dans la glace durant 5 min. La décharge électrique (2.5 kV, 25 µFarad, 100Ω) est réalisée avec l'appareil Gene Pulser[®] II (Bio-Rad). Après l'électroporation, les cellules sont immédiatement reprises dans 1 ml de milieu LB et l'ensemble est incubé pendant 1 h à 37 °C. Des volumes variables sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé contenant l'antibiotique approprié qui est le plus fréquemment de l'ampicilline à 100 µg/ml. Les boîtes sont enfin incubées à 37°C pendant une nuit.

III.1.c. Transformation de *B. subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie naturellement compétente pour la transformation. Plusieurs colonies fraîches de *B. subtilis* sont inoculées dans 1 ml de milieu MG1 et incubé à 37°C sous agitation pendant 4.5-5 h. La culture est ensuite diluée 10 fois dans le milieu MGII, et est réincubée pendant 90 min à 37°C. Au bout de ce temps 5 µl de l'ADN sont additionnés de 200 µl de la culture et le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. 200 µl de la culture sans l'ajout d'ADN est également utilisé comme témoin. Les cellules sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé supplémenté de l'antibiotique de sélection. Les antibiotiques utilisés avec leurs concentrations sont: chloramphénicol 5µg/ml, érythromycine 1µg/ml, kanamycine 10 µg/ml, phléomycine 0.5µg/ml et spectinomycine 100µg/ml.

III.2. Criblage des transformants

III.2. a. Résistances aux antibiotiques

C'est l'étape primaire pour la sélection des clones ayant intégrés les vecteurs (vides ou recombinants) qui confèrent aux cellules les différentes résistances aux antibiotiques.

III.2.b. Vérifications des clones par PCR

Sur une sélection de clones une PCR est effectuée en utilisant les amorces de clonage ou des amorces à l'extérieur des sites de clonage. L'électrophorèse sur gel d'agarose permettra d'identifier les clones qui ont intégré le gène d'intérêt.

III.2.c. Le séquençage

Les plasmides ou les produits de PCR correspondant aux clones potentiellement positifs sont séquencés par la société Beckman Coulter Genomics.

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences répertoriées dans les banques de données de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi ou par alignement sur <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

III.3. Construction des mutants et des vecteurs

Sauf cas indiqué, l'ADN chromosomique de BSB168 est utilisé comme matrice pour les amplifications.

Les différentes amorces utilisées dans ce travail sont listées dans le Tableau 12

Tableau 12: Liste des amorces utilisées dans cette étude

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Utilisation
DamonMtlSphI	ACGATT <u>G</u> CATGCGCAGTGCAGGTTTAATTCAGC	Délétion <i>mtlAFD</i>
RamonMtlSacII	ATCGAT <u>CCGCGG</u> ACTTTGGCACATGACTGTGAC	
DavalMtlSpeI	ACGTAC <u>ACTAGT</u> GACCACCCGTGACACAATGTC	
RavalMtlSalI	ATGCTAG <u>T</u> CGACAATGTCGCGTGTTTTGATGCC	
RamontEIIBA-SacII	ATCGAT <u>CCGCGG</u> CCTTGGCTTTTCTTCCCCTTCATGG	Délétion 3'- <i>mtlA</i> / <i>mtlF</i>
DamontEIIBA-SphI	ACGATT <u>G</u> CATGCTTGGGGTGATTGTAGGATCGG	
DavalEIIBA-SpeI	ACGTAC <u>ACTAGT</u> ATGATCGCCTTACATTTCCGGTGC	
RavalEIIBA-SalI	ATGCTAG <u>T</u> CGACCCGCACACCTTTGAAGTACGCCG	
BamHIDir EIIC	CGC <u>G</u> GATCCTTAGGCGCAATGATTATGGGTCC	Délétion 3'- <i>mtlA</i>
Rev EIICjonc BglII MtlF	CATGACAATAGATCTCTTTCTATAAGATTATGCTGCTTGGCTTTTCTTCCC	
Dir EIICjonc BglII MtlF	TAATCTTATAGAAAGAGATCTATTGTCATGCAAGTACTCG	
Rev HindIII MtlD	GGA <u>A</u> GCTTAGATAGTCACCAGTTTCAAGC	
EIIBBam	CCTGGATCCATGAACAAAATTATCTTTGCGTGTGATG	Clonage de 3'- <i>mtlA</i> dans les plasmides pGAD et pGBDU
r-EIIBsalI	CTC <u>G</u> TCTGACTATAAGATTACTTTTTTCAG	
BsMtlRPRD1F	ATGGGATCCGTTGTCAGCAAAGGTGAGCTG	Clonage du PRD1 dans les plasmides pGAD et pGBDU
BsMtlRPRD1R	CGC <u>G</u> TCTGACTTCTGTTTTGTATTTTCGATTTG	
BsMtlRPRD2R	CAC <u>G</u> TCTGACTTCTTCTTTTTTGTATTTCAAGAGC	Clonage du PRD2 dans les plasmides pGAD et pGBDU
BsMtlRPRD2F	AAAGGATCCTACAAAGCGCAGGAAATTGAGC	
BsMtlREIIBF	AAAGGATCCGCAAAGTGAAAGCGCTTGTCG	Clonage de EIIB ^{Gat} dans les plasmides pGAD et pGBDU
BsMtlREIIBR	GCG <u>G</u> TCTGACATCTTGGATAACTTCCATATAC	
BsMtlREIIAF	ATCGGATCCGTTCTGCGCCATTTTACGCTAG	Clonage de EIIA ^{Mtl} dans les plasmides pGAD et pGBDU
BsMtlREIIAR	CAAGT <u>C</u> GACGACGTGTGCCATGCAGGTTTACAG	
BsMtlREIIARpMAD	CGGGT <u>C</u> GACTTACAGTATGTTTTTTTCTTTCA	

XylAproBam	GAAGGATCCCTTTATTATATATCTAATGTGT TC	Promoteur <i>xyl</i>
r-XylAproNdeI	GAGATTGAGCCATATGATTTCCCCCTTAA	
EIIBNdeI	TGAACATATGAACAAAATTATCTTTGCGTGT	Clonage de 3' <i>mtlA</i> , 3' <i>mtlA</i> Cys/Asp et 3' <i>mtlA</i> Cys/Ala dans pDG1664
EIIBNdeI-Ala	TGAACATATGAACAAAATTATCTTTGCG GCTGATGCGGGAATGG	
EIIBNdeI-Asp	TGAACATATGAACAAAATTATCTTTGCG GATGATGCGGGAATGG	
r-EIIBEco	CTCGAATTCTATAAGATTACTTTTTTCAG	
D-EIICNdeI	TTTACATATGCAGCAGCAAGAACAGCAGCA AGG	Clonage de <i>mtlA</i> , <i>mtlA</i> Cys585Ala
r-EIIB-aspBglI	GATGGATGCCCCCATGGCACTTGATCCCATT CCCGCATCATCCGCAAAG	et <i>mtlA</i> Cys585Asp dans le pDG1664
r-EIIBalaBglI	GATGGATGCCCCCATGGCACTTGATCCCATT CCCGCATCAGCCGCAAAG	
YwqCForBam	GATGGGATCCGAGATAAGGAGGTATCATGG GAGAATCTAC	Construction des fusions <i>ywqC/3'-mtlA</i> , <i>ywqC/3'-mtlA</i> Cys- Asp, <i>ywqC/3'-mtlA</i> Cys- Ala et de 3' <i>mtlA</i>
YwqCRevSal	TTTTGTCGACATTCGCAATGGTGGAACTGT CCC	
EIIBMtlForSal	GAGAGTCGACCATCACCATCACCATCACGG	
EIIBMtlRevSph	GGCTGCATGCCGACTATAAGATTACTTTTTTC	
EIIBaspBam	CCTGGATCCATGAACAAAATTATCTTTGCG GATGATGCGGGAATGG	Clonage de 3' <i>mtlA</i> dans pQE30
EIIBalaBam	CCTGGATCCATGAACAAAATTATCTTTGCG GCTGATGCGGGAATGG	

III.3.1. Constructions des mutants *B. subtilis* $\Delta mtlF$, $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$, $\Delta 3'-mtlA$ et $\Delta mtlAFD$

Les mutants $\Delta mtlF$, $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$ et $\Delta mtlAFD$ ont été construits par double recombinaisons en transformant la souche PJ001 avec les plasmides pGEM-T(*mtlF* upstream-*aphA3*-*mtlF* downstream) (Joyet *et al.*, 2010), pGEM-T(3' *mtlA* upstream-*aphA3*- *mtlF* downstream) et pGEM-T (*mtlA* upstream-*aphA3*- *mtlD*). Des séquences en amont et en aval des gènes 3' *mtlA/mtlF* et *mtlAFD* ont été amplifiés respectivement avec les couples d'amorces : DamontEIIBA-SphI/ DavalEIIBA-SpeI ; RavaleEIIBA-SalI/ BamHIDir EIIC pour la délétion

de 3'-*mtlA/mtlF* et DamonMtlSphI/ RamonMtlSacII ; DavalMtlSpeI/ RavalMtlSalI pour la délétion de *mtlAFD*.

Le mutant $\Delta 3'$ -*mtlA* est construit par PCR 3 voies. Les deux premières PCR sont réalisées avec les amorces BamHIDir EIIC/ Rev EIICjonc BglII MtlF et Dir EIICjonc BglII MtlF/Rev HindIII MtlD. Le produit de la PCR 3 voies est cloné dans le vecteur pMAD Δ HindIII coupé BamHI-HindIII. Le plasmide résultant est utilisé pour transformer la souche $\Delta 3'$ -*mtlA* Δ *mtlF*.

Les différents mutants criblés par les pressions de sélection appropriées sont vérifiés par PCR et leurs séquences sont confirmées par séquençage.

III.3.2. Construction des vecteurs pour la complémentation

Les couples d'amorces XylAproBam/ r-XylAproNdeI ; EIIBNdeI/ r-EIIBEco ; EIIBNdeI-Asp/ r-EIIBEco ; EIIBNdeI-AIA / r-EIIBEco et D-EIICNdeI/r-EIIBEco ont été utilisés pour amplifier *Pxyl* avec Shine Dalgarno du gène *xyl*, 3'-*mtlA*, 3'-*mtlA* (Cys-Asp), 3'-*mtlA* (Cys-Ala), et *mtlA* respectivement. L'ADN chromosomique a servi de matrice. Ces fragments ont été insérés dans les sites *EcoRI* et *BamHI* du vecteur pDG1664 (Guérout-Fleury *et al.*, 1996) pour générer les plasmides pDGEIIBwt, pDGEIIBasp, pDGEIIBala, pDGMtlA respectivement où 3'-*mtlA* et *mtlA* entier sont exprimées sous contrôle du promoteur *xyl*.

Le plasmide pDGMtlA est utilisé pour la construction des plasmides pDGMtlAasp et pDGMtlAala. Dans un premier temps nous avons construit le plasmide pDG1664MtlAwt Δ BglII. Pour cela le plasmide pDG1664MtlA est coupé avec MscI/EcoRV, un fragment de 2145pb est excisé du plasmide pour enlever le site BglII. Cette excision fait perdre aussi le gène *bla* codant pour la résistance à l'ampicilline et aussi l'origine de répllication du plasmide. Cette dernière est remplacée par l'origine de répllication de plasmide pACYC 184 coupée avec les deux enzymes PvuII-EcoRV. La sélection du plasmide résultant est la résistance à la spectinomycine chez *E.coli* et la résistance à la spectinomycine et à l'érythromycine chez *B.subtilis*. Pour remplacer la cystéine de EIIB par une aspartate ou une alanine deux PCR sont faites respectivement avec les deux couples d'amorces XylAproBam/r-EIIB-aspBglI et XylAproBam/r-EIIB-alaBglII. Les fragments obtenus remplaceront le fragment coupé BamHI-BglII du plasmide pDGMtlAwt Δ BglII. Le résidue Cys phosphorylable se trouve en position 8 dans EIIB^{Mtl} codé par 3'-*mtlA*; dans les EIIB des PTS de la classe lactose le Cys se trouve entre position 7 (EIIB^{Lic} de *B. subtilis*) et position 9 (EIIB^{Lac} de *Staphylococcus aureus*).

Les constructions résultantes ont été vérifiées par séquençage. Puis, ces plasmides ont été utilisés pour insérer les différentes allèles de *3'-mtlA* et de *mtlA* au locus *thrC* des mutants $\Delta 3'-mtlA\Delta mtlF$ et $\Delta mtlAFD$ de *B. subtilis*.

III.3.3. Construction de la fusion *ywqC::3'-mtlA*

La fusion du gène *ywqC* tronqué et du fragment d'ADN *3'-mtlA* est réalisée dans le plasmide répliatif pBQ200, qui porte le promoteur constitutive *PdegQ36* (Martin-Verstraete *et al.*, 1994). Le gène *ywqC* tronqué de la région codant les 34 acides aminés en partie C terminale est amplifié avec les amorces YwqCForBam/ YwqCRevSal à partir de l'ADN chromosomique de BSB168. Le fragment obtenu correspondant au gène *ywqC* tronqué est cloné dans le plasmide pBQ200 aux sites BamHI-SalI. Les gènes *3'-mtlA*, *3'-mtlA(Cys/Ala)* et *3'-mtlA(Cys/Asp)* sont amplifiés avec les amorces EIIBMtlForSal/ EIIBMtlRevSph à partir des plasmides pQE30EIIB, pQE30EIIBAla et pQE30EIIBAsp. Les fragments obtenus sont clonés dans le plasmide pBQ200ywqC coupé avec les enzymes de restriction SalI/SphI.

Les plasmides pQE30EIIB, pQE30EIIBAla et pQE30EIIBAsp sont obtenus par le clonage des fragments d'ADN *3'-mtlA* sauvage, *3'-mtlA (Cys/Asp)* et *3'-mtlA (Cys/Ala)* codant respectivement EIIB^{Mtl} wt et EIIB^{Mtl} (Cys/Asp) et EIIB^{Mtl} (Cys/Ala) coupés des plasmides pGADEIIB, pGADEIIBAsp et pGADEIIBAla avec BamHI/SalI.

Un plasmide pBQ200 *3'-mtlA* où *3'-mtlA* est cloné sans la fusion à *ywqC* est aussi construit. Le plasmide pDG1664EIIB a servi de matrice pour amplifier *3'-mtlA* avec le Shine Dalgarno du *xylA*.

III.3.4. Construction des plasmides pour le test d'interaction par double hybride

Les deux plasmides utilisés dans ce test sont pGAD-C1 et pGBDU-C1. Les fragments d'ADN *3'-mtlA*, *3'-mtlA(Cys/Asp)*, *3'-mtlA(Cys/Ala)*, *mtlR*, et les fragments d'ADN codant pour les domaines de MtlR : PRD1, PRD2, PRD1/PRD2, PRD2EIIB^{Gat}, EIIB^{Gat}, EIIA^{Mtl}-like, EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like, EIIB^{Gat}Cys419AspEIIA^{Mtl}-like, EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-likeHis599Asp, EIIB^{Gat}Cys419AspEIIA^{Mtl}-likeHis599Asp de *B. subtilis* ont été clonés dans le plasmide pGBDU-C1 (Ura+), à l'extrémité C-terminale du domaine de liaison à l'ADN (BD) de l'activateur transcriptionnel GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* et dans le plasmide pGAD-C1 (Leu+) fusionnés au domaine d'activation (AD) de la transcription de GAL4.

Le Tableau 14 résume les différentes protéines criblées et les amorces utilisées pour le clonage des gènes correspondants.

Tableau 13 : Les protéines clonées dans pGBDU et pGAD et la liste des amorces utilisées

Nom de la protéine clonée	Noms du couple d'amorces utilisées
EIIB	EIIBBam/ r-EIIBsalI
EIIB(Cys/Asp)	EIIBaspBam /r-EIIBsalI
EIIB(Cys/Ala)	EIIBalaBam /r-EIIBsalI
PRD1	BsMtlRPRD1F /BsMtlRPRD1R
PRD2	BsMtlRPRD2F /BsMtlRPRD2R
PRD1-PRD2	BsMtlRPRD1F/ BsMtlRPRD2R
PRD2EIIB ^{Gat}	BsMtlRPRD2F /BsMtlREIIBR
EIIB ^{Gat}	BsMtlREIIBF /BsMtlREIIBR
EIIA ^{Mtl} -like	BsMtlREIIAF/ BsMtlREIIAR
EIIB ^{Gat} EIIA ^{Mtl} -like	BsMtlREIIBF/ BsMtlREIIAR
EIIB ^{Gat} Cys419AspEIIA ^{Mtl} -like	BsMtlREIIBF/ BsMtlREIIARpMAD
EIIB ^{Gat} EIIA ^{Mtl} -like His599Asp	
EIIB ^{Gat} Cys419AspEIIA ^{Mtl} -like His599Asp	

Le gène *mtlR* cloné dans les plasmides pour le double hybride a été obtenu par digestion du plasmide pQE30*mtlR* (Joyet *et al.*, 2010), avec les enzymes BamHI/SalI. Les plasmides pMAD Δ HindII-*mtlRC419D* et pMAD Δ HindII-*mtlRH599D* (Joyet *et al.*, 2010) sont utilisés, respectivement, comme matrice pour amplifier le domaine EIIB^{Gat}Cys419AspEIIA^{Mtl}-like et EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-likeHis599Asp. Pour avoir le plasmide pGBDU avec la double mutation Cys419Asp et His599Asp, le fragment d'ADN codant la partie N-terminale de l'EIIA^{Mtl}-like du plasmide pGBDU-EIIB^{Gat}C419DEIIA^{Mtl}-like est remplacé par le fragment codant la partie

N terminale de EIIA^{Mtl}-likeHis599Asp du plasmide pGBDU-EIIB^{Gat}EIIAH599D. Les deux fragments sont digérés avec les enzymes NheI/PstI. Le plasmide pGBDU-EIIB^{Gat}C419DEIIAH599D résultant est coupé avec les enzymes BamHI et PstI. Le fragment obtenu est cloné dans pGAD-C1 digéré avec les mêmes enzymes de restrictions pour l'obtention du vecteur pGAD-EIIB^{Gat}C419DEIIAH599D.

IV. Détermination de l'interaction des protéines par le test double hybride

IV. 1. Double hybride chez la levure

Le système double hybride chez la levure a été développé par Fields et Song en 1989 (Fields et Song, 1989) comme un outil génétique efficace pour identifier des partenaires d'interaction d'une protéine donnée en exploitant les propriétés de la protéine GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine GAL4 est un activateur transcriptionnel nécessaire pour l'expression des gènes codant pour l'utilisation du galactose (Johnston, 1987). Cet activateur transcriptionnel est constitué de deux domaines fonctionnels. Un domaine N-terminal, Binding Domain (BD) qui se fixe spécifiquement à des séquences d'ADN (UAS) (*upstream activation sequences*) et un domaine C-terminal, Activating Domain (AD) qui est nécessaire pour activer la transcription. Le principe de ce système repose sur la possibilité de scinder l'activité du facteur de transcription GAL4 et de fusionner chacun des domaines à une protéine d'intérêt, créant ainsi deux protéines hybrides. C'est la formation d'un complexe protéine-protéine qui va rétablir la proximité des domaines permettant la reconstitution du facteur de transcription fonctionnel et ainsi activer la transcription des gènes rapporteurs que l'on pourra sélectionner (Voir Figure 11).

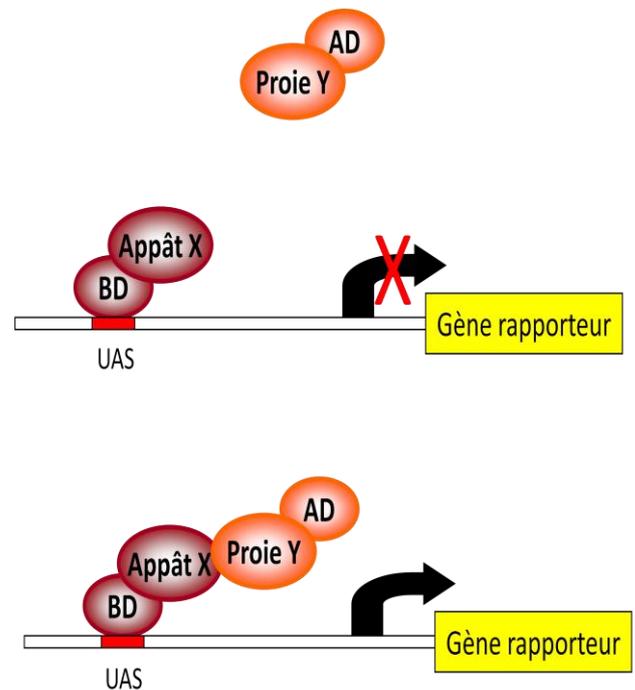
IV. 2. Préparation des cellules compétentes

On ensemence 50 ml du milieu YEPD à DO = 0.15 avec une préculture overnight dans le même milieu de la souche de *S.cerevisiae* PJ69-4 (alpha et A) qui est à une DO~1.8. Incuber à 30°C et 250 rpm d'agitation jusqu'à une DO = 0.6. Centrifuger 10 min à 3500 rpm et puis resuspendre le culot dans 2 ml d'H₂O stérile. Transférer la suspension dans un tube Eppendorf de 2 ml et centrifuger 1 min à 8000 rpm. S'en suit une série de quatre lavages qui s'effectuent par deux fois une resuspension dans de l'H₂O et deux resuspensions dans une solution d'acétate de lithium LiAc/TE à 0.1M. Entre chaque lavage une centrifugation des cellules (1 min, 8000 rpm) est réalisée, Finalement, le culot est repris dans 250 µl de LiAc/TE. Les cellules compétentes sont à utiliser le jour même et ne sont pas congelées.

Figure 11 : Le système double hybride dans la levure

Les gènes codant des protéines (X et Y) soupçonnées d'interagir sont fusionnés au domaine de liaison (BD) du facteur de transcription GAL4 qui se fixe à une séquence opératrice (UAS), et à la région d'activation (AD) de ce même activateur.

En absence d'interaction entre X et Y, la GAL4 ne peut pas se reconstituer et le gène rapporteur n'est pas exprimé. Une interaction protéine/protéine entre X et Y rapproche les domaines de la GAL4 qui vont s'interagir et l'activité transcriptionnelle sera rétablie. Les gènes rapporteurs apportent à la levure l'auxotrophie à l'histidine et l'adénine.



IV. 3. Transformation par choc thermique

La transformation s'effectue sur un mélange de 50 μ l de cellules compétentes, de 5 μ l (10 mg/ml) d'ADN carrier (soit calf thymus dénaturé, soit herring sperm), 100 ng du plasmide et 350 μ l PEG4000 à 40%. Bien homogénéiser en inversant doucement le tube. Une incubation de 30 min à 30°C est suivie d'un choc thermique à 42°C pendant 20 min. A chaque mélange 700 μ l d'H₂O sont ajoutés, homogénéiser puis centrifuger. Le culot est repris dans 100 μ l d'H₂O stérile puis étaler sur boîte contenant un milieu de sélection selon le plasmide. L'incubation s'effectue pendant une semaine à 30°C.

IV. 4. Détermination des interactions en double hybride chez la levure

La conjugaison noue permet de sélectionner les diploïdes sur un milieu dépourvu de leucine et d'uracile. En effet, pour pouvoir se développer les levures vont devoir maintenir leurs vecteurs pGBDU et pGAD contenant respectivement les gènes marqueurs d'auxotrophie URA3 et LEU2 qui codent, dans cet ordre, pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'uracile et la leucine.

Les protéines dont les gènes sont clonés dans pGAD-C1 sont fusionnées avec le domaine activateur (AD, *Activator domain*) de la polymérase de GAL4 et celles dont le gène est cloné dans pGBDU-C1 sont fusionnées avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (BD, *Binding domain*). S'il y a interaction entre les deux protéines, l'activateur de transcription GAL4 en état fonctionnel est mimé et les gènes HIS3 et/ou ADE2 sont transcrits. Ces deux gènes sont sous le contrôle de deux promoteurs différents GAL4-dépendants. Le produit de ces gènes

permet à la levure de se développer sur des milieux sans histidine ou sans adénine. La figure 12 présente un descriptif générale des étapes principales du test double hybride

Le promoteur contrôlant l'expression du gène HIS3 possède une UAS (Upstream Activation Sequence) de GAL4 forte ce qui permet la détection d'interactions faibles. Celui contrôlant l'expression du gène ADE2 possède une UAS de GAL4 plus faible ce qui permet la détection d'interactions fortes. Une interaction est jugée positive (+) quand de nombreuses colonies sont visibles en patches sur l'ensemble des milieux sélectifs

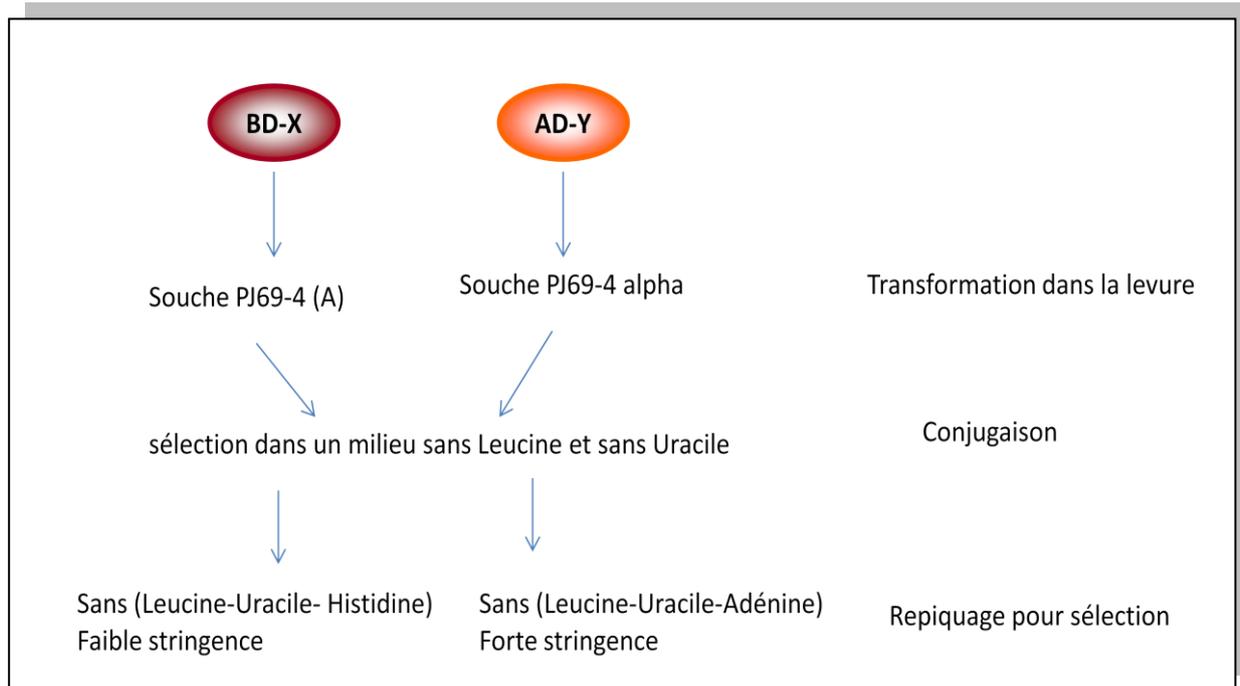


Figure 12: Description des différentes étapes du test double hybride

V. Mesure de l'activité β galactosidase

Un milieu LB additionné de l'antibiotique approprié estensemencé avec une préculture de la veille au centième. Après une incubation à 37°C sous agitation jusqu'à une $DO_{600} = 0.4-0.06$ deux fois 1 ml de la culture sera mis dans un tube et une culture sera complété avec du mannitol (concentration finale 1%). Le tout est incubé une heure à 37°C sous agitation. Les cultures sont centrifugées à 9000 rpm pendant 4 min et les culots sont laver avec du TamponZ 1X. Après une deuxième centrifugation les culots sont repris dans 1 ml de tamponZ. Le toluène est utilisé pour la perméabilisation des cellules. L'activité β - galactosidase est mesurée à une longueur d'onde de 420 nm avec le programme 'autorate' du spectrophotomètre Kontron Bio-Tek. L'activité est exprimée en ΔDO_{420} par minute par μg de protéines.

Résultats et Discussion

I. Objectifs du travail

Les bactéries sont capables d'utiliser différents hydrates de carbones comme seule source de carbone et d'énergie. Les gènes et les opérons impliqués dans le transport et le catabolisme de ces hydrates de carbones sont dans la majorité des cas exprimés seulement en présence de cette source et en absence d'une source de carbone facilement utilisable. Ces opérons peuvent être induits par l'augmentation du taux de la transcription via les activateurs ou répresseurs transcriptionnels ou par l'élongation des transcrits dépendants des antiterminateurs. Dans chaque cas les régulateurs répondent à la disponibilité de l'inducteur dans le milieu.

Le D-Mannitol est un polyol largement répandu dans la nature et plusieurs bactéries comme les entérobactéries (Jacobson *et al.*, 1983), *Bacillus* (Deutscher *et al.*, 1994), *Geobacillus* (Henstra *et al.*, 1996), *Enterococcus* (Fischer *et al.*, 1991) et *Staphylococcus* (Reiche *et al.*, 1988) ont la capacité de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie via le Phosphoenolpyruvate:carbohydate Phosphotransferase System (PTS). Les gènes de l'opéron mannitol *mtlA*, *mtlF*, *mtlD*, et *mtlR* codent respectivement pour les enzymes EIICB^{Mtl} (ou EIICBA^{Mtl}), EIIA^{Mtl}, mannitol-1-phosphate déshydrogénase et le régulateur MtlR.

A l'exception de *B.subtilis*, le gène *mtlR* chez les firmicutes est situé entre les deux gènes *mtlA* et *mtlF*. Une grande protéine de 78 kDa, MtlR des firmicutes est un activateur transcriptionnel qui appartient à la famille des régulateurs DeoR composé d'un domaine HTH suivi de deux PRDs, un domain EIIB^{Gat} et un domaine EIIA^{Mtl}-like.

MtlR contrôle l'expression des gènes codant les protéines du PTS spécifiquement impliquées dans le transport du mannitol et le mécanisme général de la régulation de son activité est basé sur sa phosphorylation par des composants du PTS. MtlR de *B. subtilis* est phosphorylé par EI et HPr sur His-342 du PRDII et probablement aussi sur His-399. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activité de MtlR. Cependant des tests *in vitro* n'ont pas permis de révéler une phosphorylation sur le PRDI (Joyet *et al.*, 2010). MtlR de *B. subtilis* est phosphorylé aussi par EI, HPr, EIIA^{Mtl} et EIIB^{Mtl} sur His-599 du domaine EIIA^{Mtl}-like, sans que cette phosphorylation ait un effet négatif important sur l'activité de MtlR. L'effet négatif majeur sur l'activité de MtlR est attribuée à la phosphorylation sur le résidu Cystéine 419 du domaine EIIB^{Gat} par P~EIIA^{Mtl} (Joyet *et al.*, 2010). En présence de mannitol qui est donc transporté et phosphorylé par le PTS, la P~EIIB^{Mtl} transfère son groupement phosphate au substrat et par

conséquent MtlR, qui est actif, n'est pas phosphorylé sur Cys-419 de son domaine EIIB^{Gat}-like.

L'activité de MtlR a été étudiée dans des mutants par délétions des différents éléments du PTS. La délétion de *ptsI* (Joyet *et al.*, 2010) ou seulement le remplacement de la His-15 de HPr par une alanine (Heravi *et al.*, 2011) rendent MtlR inactive. Cela confirme l'importance de la phosphorylation par HPr du PRDII dans l'activité de MtlR. Cette activité est prévenue en présence d'un sucre rapidement métabolisable qui détourne le phosphate de l'HPr pour son transport, c'est un cas de la répression catabolique. La délétion de *mtlF* qui code pour EIIA^{Mtl} cause une activité constitutive de MtlR (Joyet *et al.*, 2010), confirmant l'effet inhibiteur de la phosphorylation de la Cys-419 du domaine EIIB^{Gat}-like par P~EIIA^{Mtl} sur l'activité de MtlR.

Après l'établissement du lien entre l'état de phosphorylation du régulateur et son activité, le travail de cette thèse a pour objectif principal de comprendre un nouveau phénomène de régulation de MtlR impliquant la protéine du PTS, EIIB^{Mtl}.

Dans ce but, la délétion des deux gènes *mtlA* et *mtlF* (codant pour EIICB^{Mtl} et EIIA^{Mtl} respectivement) ou de *mtlF* et la partie 3' de *mtlA* codant pour le domaine EIIBA^{Mtl} ont été réalisés. La mesure de l'activité de MtlR est déterminée par l'expression de la fusion *Pmtl-lacZ*. Un mutant Δ *mtlF* montre une forte expression constitutive de la fusion. La délétion de *mtlA* abolit cette activité. L'inhibition de l'activité est aussi remarquée lorsque en plus de *mtlF* on délète seulement la partie 3' du *mtlA* (qui code pour EIIB^{Mtl}). D'où notre hypothèse que EIIB^{Mtl} devrait jouer un rôle central et important dans l'activation du régulateur MtlR.

Dans mon travail de thèse nous avons voulu répondre à plusieurs questions concernant le rôle de EIIB^{Mtl} dans la régulation de MtlR :

- La protéine EIIB^{Mtl} serait-elle essentielle pour l'activité de MtlR ?
- La protéine EIIB^{Mtl} interagirait-elle directement avec MtlR ? Si oui, avec quel(s) domaine(s) de MtlR ?
- Sous quelles formes la protéine EIIB^{Mtl} interagirait-elle avec MtlR ?

Les réponses à ses questions n'étaient pas toujours claires; elles sont reportées dans l'article présenté ci-après. Il faut remarquer que nous avons eu quelques surprises.

II. Présentation générales des résultats

La protéine EIIB^{Mtl} serait-elle essentielle pour l'activité de MtlR ?

Dans une étude antérieure, l'effet de la phosphorylation sur l'activité de MtlR dans des mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta mtlF$ a été déterminé (Joyet *et al.*, 2010). L'inactivation du *ptsI* provoque une perte totale de l'activité de MtlR dans la souche sauvage ainsi que dans tous les mutants *mtlR* étudiés (His230Ala/His289Ala, Cys419Ala, Cys419Ala/His599Ala et His 599Ala) à l'exception du mutant His342Asp qui mime la phosphorylation sur le PRDII et qui, donc, rend MtlR active même en absence de l'EI.

La délétion de *mtlF* cause une expression constitutive de la fusion *Pmtl-lacZ* dans tous les mutants *mtlR* testés à l'exception des mutants *mtlRHis342Ala* et *mtlRHis599A* (Joyet *et al.*, 2010).

Dans ce travail nous avons étudié l'activité de MtlR dans les mutants $\Delta mtlAFD$. La délétion de l'opéron entier cause une inhibition de l'activité de MtlR malgré que MtlR ne soit pas phosphorylé sur la Cys 419, le site majeur de sa régulation négative. Cela peut être lié à l'absence de EIIB^{Mtl} ou de EIIC^{Mtl}. Afin de distinguer entre ces deux possibilités nous avons également construit un mutant $\Delta 3'mtIA \Delta mtlF$, dans lequel la protéine EIIA^{Mtl} et le domaine EIIB^{Mtl} sont délétés. Ce mutant montre le même phénotype d'inhibition de l'activité β -galactosidase comme le mutant $\Delta mtlAFD$.

Par des tests de qRT-PCR nous avons pu montrer que l'activité β -galactosidase très faible dans ces mutants n'est pas due à une régulation post-transcriptionnelle. Ces tests ont montré que l'opéron est inductible en présence de mannitol dans la souche sauvage et que les mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtIA \Delta mtlF$ expriment très faiblement la fusion *Pmtl-lacZ*.

Il est clair donc que l'absence de EIIB^{Mtl} a un effet négatif sur l'activité de MtlR.

La protéine EIIB^{Mtl} interagirait-elle directement avec MtlR ? Si oui, avec quel(s) domaine(s) de MtlR ?

Les expériences de double hybride ont montré une interaction directe, spécifique et bidirectionnelle entre les deux protéines EIIB^{Mtl} et MtlR. Cette interaction est précisément observée avec les domaines EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like de MtlR. Il est intéressant de noter aussi

qu'une interaction MtlR-MtlR est observée et que les domaines EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like pourraient avoir un effet sur l'oligomérisation de MtlR.

Sous quelles formes la protéine EIIB^{Mtl} interagirait-elle avec MtlR ?

Soluble ou fusionnée à la membrane ?

La complémentation des mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtLA \Delta mtlF$ avec EIIB^{Mtl} cloné dans le plasmide ectopique pDG1664 n'a pas restauré l'activité constitutive de MtlR observée dans le mutant $\Delta mtlF$. Cependant une expression constitutive est observée lorsque les mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtLA \Delta mtlF$ sont complémentés avec la protéine fusionnée EIICB^{Mtl}.

Pour connaître l'implication ou plutôt la non-implication de EIIC^{Mtl} dans cette activité nous avons également compléter ces mutants avec EIIB^{Mtl} fusionnée à la protéine membranaire YwqC. Cette fusion a pour rôle de rapprocher EIIB^{Mtl} à la membrane. L'expression de la fusion *ywqC/3' mtlA* rétablit aussi l'expression de *Pmtl-lacZ* dans le mutant $\Delta 3'mtLA \Delta mtlF$ et d'un niveau moindre dans le mutant $\Delta mtlAFD$ ce qui suggère que EIIC^{Mtl} joue un rôle inférieur dans l'activité de MtlR et que la séquestration de MtlR par EIIB^{Mtl} est nécessaire à son activation.

Phosphorylée ou non phosphorylée ?

Les expériences de double hybride, outre la mise en évidence de l'interaction entre les deux protéines EIIB^{Mtl} et MtlR, ils nous ont aussi donné une indication préliminaire que c'est la forme non phosphorylée de EIIB^{Mtl} qui interagisse avec MtlR. EIIB^{Mtl} est une protéine de *Bacillus subtilis* qui n'est pas phosphorylé dans la cellule de la levure *Saccharomyces* utilisée dans le test double hybride.

De plus, quand les souches $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtLA \Delta mtlF$ sont complémentées avec YwqCEIIB^{Mtl}Cys/Asp elles montrent qu'une faible activité de MtlR au moment où la complémentation avec YwqCEIIB^{Mtl}Cys/Ala donne le même niveau d'activité observé dans le cas d'une complémentation avec YwqCEIIB^{Mtl}sauvage. Les mêmes niveaux d'expression sont obtenus lorsque les mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtLA \Delta mtlF$ sont complémentés avec EIICBCys/Asp et EIICBCys/Ala. (Figure13)

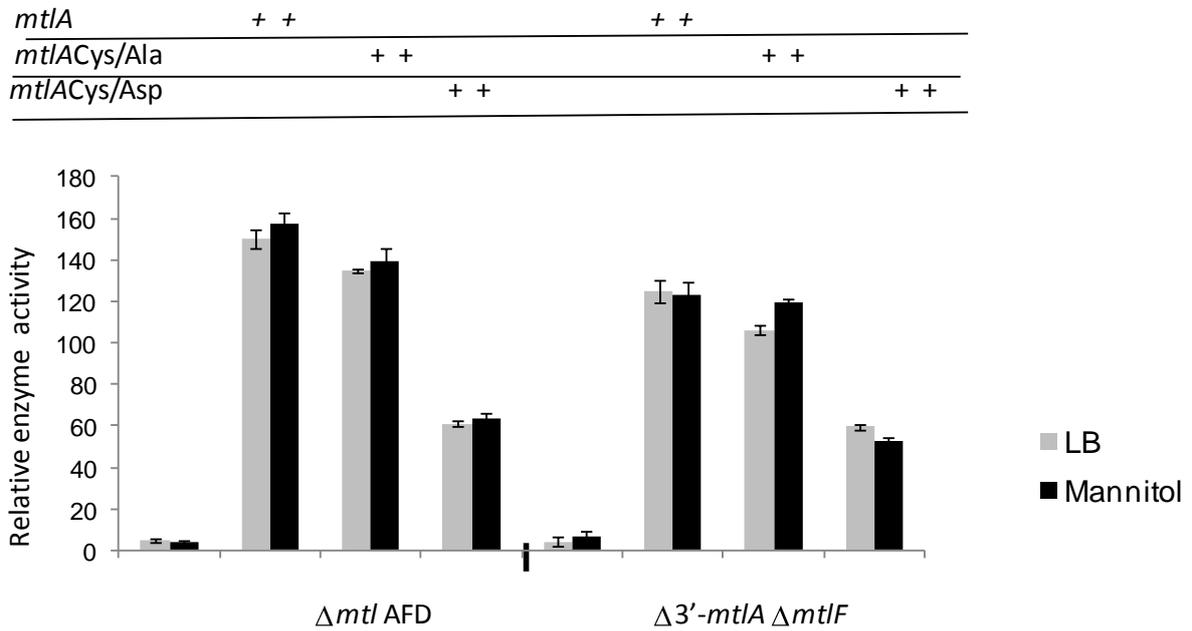


Figure 13 : Expression de la fusion *Pmtl-lacZ* dans les mutants $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$ et $\Delta mtlAFD$ sans et avec la complémentation avec MtlA, MtlACys 396Ala et MtlA Cys396 Asp.

Membrane sequestration by the EIIB domain of the mannitol permease activates the *Bacillus subtilis* *mtl* operon regulator MtlR

<http://mc.manuscriptcentral.com/mmi>

Houda Bouraoui^{1,2,3}, Magali Ventroux^{1,2}, Marie-Françoise Gros-Noirot^{1,2}, Josef Deutscher^{1,2,4,*}, Philippe Joyet^{1,2}

¹Institut de la Recherche Agronomique, UMR1319 Microbiologie De L'alimentation Au Service De La Sante Humaine (Micalis), F-78350 Jouy-En-Josas, France

²AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-En-Josas, France

³Universite El Hadj Lakhdar, Departement De Biologie, Batna, Algerie

⁴Centre National de la Recherche Scientifique, SNC9130 Micalis, F-78350 Jouy-En-Josas, France.

*For correspondence. E-mail Josef.Deutscher@grignon.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 81 54 47 ; Fax (+33) 1 30 81 54 57;

Running title: *B. subtilis* MtlR sequestration by the EIIB^{Mtl} domain

Key words: *Bacillus subtilis*, phosphotransferase system, mannitol, protein interaction, transcription activation

Summary

In most firmicutes expression of the mannitol operon is regulated by the transcription activator MtlR, which is controlled via multiple phosphorylation of its regulatory domains by components of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS). We here demonstrate that in order to be active *Bacillus subtilis* MtlR also needs to interact with the EIIB^{Mtl} domain of the mannitol permease MtlA. Deletion of *mtIF* (encodes EIIA^{Mtl}) causes constitutive *mtIAFD* operon expression. However, additional deletion of 3'-*mtIA* (EIIB^{Mtl} domain) or entire *mtIA* renders MtlR inactive. Yeast two-hybrid experiments revealed a direct interaction of the EIIB^{Mtl} domain with the two C-terminal domains of MtlR. Complementation of the $\Delta 3'$ -*mtIA* Δ *mtIF* or *mtIAFD* mutants with *mtIA* restored constitutive MtlR activity. However, MtlR remained inactive when the $\Delta 3'$ -*mtIA* Δ *mtIF* or *mtIAFD* mutants were complemented with only EIIB^{Mtl}. Moreover, synthesis of EIIB^{Mtl} in strains producing constitutively active MtlR caused MtlR inactivation. However, when EIIB^{Mtl} was fused to the C-terminus of the membrane-spanning YwqC it restored constitutive MtlR activity in the $\Delta 3'$ -*mtIA* Δ *mtIF* and *mtIAFD* mutants suggesting that MtlR activation is mainly due to EIIB^{Mtl}-mediated membrane sequestration. Replacing the phosphorylatable Cys with Asp in EIIB^{Mtl} lowered MtlR activation compared to YwqC-EIIB^{Mtl}, indicating that MtlR is mainly activated by unphosphorylated EIIB^{Mtl}.

Introduction

D-Mannitol is a polyol widely used as low-calorie sweetener in food industry. It is present in large quantities in plants (Oddo *et al.*, 2002), fungi and algae. Many bacteria, including enterobacteria (Jacobson *et al.*, 1983), bacilli (Deutscher *et al.*, 1994), geobacilli (Henstra *et al.*, 1996), lactobacilli (De Boeck *et al.*, 2010), enterococci (Fischer *et al.*, 1991), staphylococci (Reiche *et al.*, 1988) and others therefore developed the capacity to use this polyol as carbon and energy source. Mannitol is usually taken up by bacteria via the phosphoenolpyruvate (PEP):carbohydrate phosphotransferase system (PTS), which phosphorylates mannitol to mannitol-1-P during the transport process. Mannitol-1-P dehydrogenase, which is encoded by the *mtlD* gene, converts intracellular mannitol-1-P into fructose-6-P, which is subsequently metabolized via glycolysis.

In order to be functional, the PTS needs the three sugar-specific domains (or proteins) EIIA, EIIB and EIIIC as well as the two general PTS components enzyme I (EI) and HPr (Deutscher *et al.*, 2006). The two latter proteins form a phosphorylation cascade together with the EIIA and EIIB components by using PEP as phosphoryl donor. In the first step, EI autophosphorylates with PEP and transfers the phosphoryl group to His-15 in HPr. In most firmicutes, P~His-HPr is the only phosphoryl donor for the usually several sugar-specific EIIA components. The EIAs transfer their phosphoryl group to EIIB molecules with the same sugar specificity and P~EIIB phosphorylates the carbohydrate bound to the corresponding membrane-integral EIIIC component. In the last step the phosphorylated carbohydrate is released into the cytoplasm.

While in enterobacteria and other proteobacteria the three EII components necessary for mannitol transport are usually fused to a single three-domain protein, the EIIA^{Mtl} component of firmicutes constitutes a distinct protein (Reiche *et al.*, 1988; Reizer *et al.*, 1992). Accordingly, the *mtl* operon of proteobacteria contains the genes *mtlA* and *mtlD*, with *mtlA* encoding the three-domain permease and in firmicutes the *mtlA*, *mtlF* and *mtlD* genes, with *mtlA* encoding the two-domain permease and *mtlF* the EIIA^{Mtl} protein. In addition, a gene encoding a transcription regulator, MtlR, is usually associated with the *mtl* operon. In *E. coli* and other proteobacteria *mtlR* follows *mtlA* and *mtlD* and encodes a small protein of about 20 kDa, which was proposed to function as indirect repressor of the *mtl* operon without presumably directly interacting with the presumed operator site (Tan *et al.*, 2009). In *Vibrio cholerae* *mtlA* was recently reported to be constitutively expressed, but the *mtlA* RNA was only translated when mannitol was present in the growth medium. In the absence of mannitol MtlA synthesis seemed to be prevented by a mannitol-repressed small RNA (MtlS sRNA)

transcribed antisense to the 5' untranslated region of the *mtl* operon (Mustachio *et al.*, 2012). In proteobacteria MtlR might therefore be involved in regulating the amount of MtlS in response to the absence or presence of mannitol. Firmicutes also contain an *mtlR* gene that is usually located between *mtlA* and *mtlF*. *Bacillus subtilis* is an exception to this rule, because the *mtlR* gene of this organism is located about 15 kb downstream from the *mtl* operon (Watanabe *et al.*, 2003). MtlR of firmicutes is an about 75 kDa protein that is completely different from MtlR of proteobacteria and that functions as transcriptional activator. It is a member of a large group of regulatory proteins which are composed of an N-terminal DNA binding domain followed by usually four regulatory domains (Deutscher *et al.*, 2006). In MtlR two PTS regulation domains (PRDs) are followed by an EIIB^{Gat}- and an EIIA^{Mtl}-like domain. The activity of MtlR is regulated via multiple phosphorylations by PTS proteins. MtlR of *Geobacillus stearothermophilus* was reported to be phosphorylated in vitro by EI and HPr at conserved histidyl residues in PRD1 and PRD2 (Henstra *et al.*, 1999). Phosphorylation of PRD2 increased the affinity of MtlR for the *mtl* operator site, whereas phosphorylation at PRD1 had the opposite effect (Henstra *et al.*, 2000). Phosphorylation occurred also at the EIIA^{Mtl}-like domain, but it required in addition to EI and HPr also EIIA^{Mtl} and the EIIB^{Mtl} domain of MtlA, i.e. the entire mannitol-PTS phosphorylation cascade. Phosphorylation of the EIIA^{Mtl}-like domain had a negative effect on MtlR function by lowering the affinity for its DNA target (Henstra *et al.*, 1999). MtlR of *B. subtilis* exhibits 41% sequence identity to MtlR from *G. stearothermophilus*, nevertheless there seem to be significant differences in their mode of regulation. MtlR of *B. subtilis* is phosphorylated in vitro by EI and HPr at His-342 and possibly also at His-399 in PRD2 (Fig. 1) and this phosphorylation is necessary to render MtlR active. Its presumed absence during growth of *B. subtilis* on glucose or other *mtl* operon-repressing sugars was proposed to serve as a catabolite control protein A (CcpA)-independent carbon catabolite repression mechanism (Joyet *et al.*, 2010). No phosphorylation of PRD1 could so far be detected. *B. subtilis* MtlR is also phosphorylated in vitro by EI, HPr, EIIA^{Mtl} and the EIIB^{Mtl} domain of MtlA at the conserved His-599 in the C-terminal EIIA^{Mtl}-like domain; but this phosphorylation had only a small negative effect on the expression of a *Pmtl-lacZ* fusion. The main negative effect on *B. subtilis* MtlR activity is exerted by the EI-, HPr- and EIIA^{Mtl}-requiring phosphorylation of the conserved cysteyle residue 419 in the EIIB^{Gat}-like domain. The absence of phosphorylation at Cys-419 leads to induction of the *mtl* operon. In the presence of mannitol P~EIIA^{Mtl} donates its phosphoryl group primarily to the EIIB^{Mtl} domain, which in turn phosphorylates mannitol and consequently Cys-419 in the EIIB^{Gat}-like domain is only poorly phosphorylated. The importance of these His or Cys phosphorylation sites for *B. subtilis* MtlR function was determined by measuring the effect of the replacement of the phosphorylatable amino acids with Ala or Asp

residues, which either prevent the phosphorylation or have a phosphomimetic effect, respectively, on the expression of a *Pmtl-lacZ* fusion (Heravi *et al.*, 2011; Joyet *et al.*, 2010). In addition, MtlR activity in mutants carrying deletions of various PTS components has been studied. Deletion of *ptsI* (encodes EI) (Joyet *et al.*, 2010) or replacement of the phosphorylatable His-15 in HPr with Ala (Heravi *et al.*, 2011) rendered MtlR inactive, confirming that phosphorylation of His-342 in PRD2 by P~His-HPr is essential for MtlR activity. In contrast, deletion of *mtlF* (encodes EIIA^{Mtl}) caused strong constitutive expression of a *Pmtl-lacZ* fusion (Joyet *et al.*, 2010), confirming the inhibition of MtlR function by P~EIIA^{Mtl}-mediated phosphorylation of Cys-419 in the EIIB^{Gat}-like domain. Deletion of *ptsI* or replacement of the phosphorylatable His-15 in HPr with Ala of course also prevents phosphorylation of Cys-419 by P~EIIA^{Mtl}. However, the inhibitory effect due to the absence of His-342 phosphorylation turned out to be dominant over the stimulating effect caused by the absence of phosphorylation at Cys-419.

We here report that the simultaneous deletion of *mtlA* and *mtlF* or of *mtlF* and only the 3' part of *mtlA* encoding the EIIB^{Mtl} domain (Fig. 1) caused inactivation of MtlR. MtlR seems to need EIIB^{Mtl} in order to be active. We observed an interaction of the two C-terminal domains of MtlR with the EIIB^{Mtl} domain of MtlA. Our results suggest that EIIB^{Mtl}-mediated membrane sequestration of MtlR is essential for the activation of its transcription activator function.

Results

Deletion of B. subtilis mtlAFD inhibits MtlR activity

MtlR has previously been shown to become phosphorylated by P~EIIA^{Mtl} at Cys-419 in the EIIB^{Gat}-like domain and this phosphorylation strongly inhibits MtlR activity. Deletion of the *B. subtilis mtlF* gene, which codes for EIIA^{Mtl}, therefore leads to strong constitutive expression of a *Pmtl-lacZ* fusion integrated in the chromosome at the *amyE* locus (Joyet *et al.*, 2010). In in vitro assays MtlR becomes also slowly phosphorylated by the P~EIIB^{Mtl} domain of MtlA at His-599 and this phosphorylation also has a negative effect on MtlR activity. The His-599-Ala replacement in MtlR caused weak constitutive, glucose-repressible expression of the *Pmtl-lacZ* fusion (Joyet *et al.*, 2010). In order to study the role of the EIIB^{Mtl} domain in MtlR regulation in more detail we constructed a mutant carrying a deletion of the entire *mtlAFD* operon. Based on the above results, we expected that the *mtlAFD* deletion mutant would exhibit strong constitutive expression of a *Pmtl-lacZ* fusion, because similar as in the *mtlF* mutant phosphorylation at both negative regulatory sites should be prevented. However, in contrast to our expectation MtlR activity in the triple deletion mutant was very low independently of whether it was grown in the presence or absence of mannitol (Fig. 2A).

Deletion of the EIIB domain of MtlA also inhibits B. subtilis MtlR activity

We suspected that the loss of the constitutive *lacZ* expression in the *mtlF* deletion mutant (Joyet *et al.*, 2010) owing to the additional deletion of the *mtlA* and *mtlD* genes was probably due to the lack of the EIIB^{Mtl} or EIIC^{Mtl} domain. In order to distinguish between these two possibilities we deleted the 3' part of the *mtlA* gene encoding the EIIB^{Mtl} domain in the previously described $\Delta mtlF$ mutant PJ004 carrying a wild-type *mtlR* gene (Joyet *et al.*, 2010). In contrast to the parental strain, which expresses the *Pmtl-lacZ* fusion constitutively, the resulting $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$ double mutant exhibited very low β -galactosidase activity independently of whether it was grown in the presence or absence of mannitol (Fig. 2A). In order to confirm the results of the β -galactosidase assays we also carried out quantitative RT-PCR (qRT-PCR) experiments with the wild-type strain and the mutants. As expected, the wild-type strain grown in LB medium in the absence of mannitol produced low levels of *lacZ* mRNA, which strongly increased when mannitol was included in the LB medium (Fig. 2B). The $\Delta mtlF$ mutant grown in the absence of mannitol also produced high levels of *lacZ* mRNA. In contrast, little *lacZ* mRNA was detected in the $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$ double mutant and the $\Delta mtlAFD$ triple mutant (Fig. 2B). These results established that in order to be active MtlR needs a functional EIIB^{Mtl} domain, which stimulates the

expression from the *PmtI* promoter and does not affect a post-transcriptional regulatory step. Because in the *mtIF* deletion mutant, which expresses the *PmtI-lacZ* fusion constitutively, the EIIB^{Mtl} domain is probably not phosphorylated owing to the absence of EIIA^{Mtl}, it is likely that MtlR activation requires the unphosphorylated form of the EIIB^{Mtl} domain.

We also constructed a strain, in which only the EIIB^{Mtl} domain was deleted. In this mutant, the EIIB^{Gat} domain of MtlR is most likely phosphorylated by EIIA^{Mtl}. In addition, induction by mannitol was not possible owing to the absence of EIIB^{Mtl} and MtlR was therefore expected to be inactive. Indeed, the $\Delta 3'$ -*mtIA* mutant exhibited very low β -galactosidase activity in the absence and presence of mannitol (Fig. 2A).

The EIIB^{Mtl} domain interacts with the two fused C-terminal domains of MtlR

In order to test whether the stimulatory effect of the EIIB^{Mtl} domain on MtlR function was mediated by direct interaction of the two proteins we carried out yeast two hybrid experiments. The entire *B. subtilis mtIR* gene and the 3' part of the *mtIA* gene encoding the EIIB^{Mtl} domain were cloned into plasmids pGAD and pGBDU as described in Experimental procedures and interaction studies were subsequently carried out by screening for growth on. A positive growth signal was obtained for the pGAD-*mtIR*/pGBDU-*mtIR* combination (Fig. 3A), indicating that the transcription regulator MtlR interacts with itself by forming oligomers, most likely dimers, as reported for other PRD-containing regulators. A positive signal was also obtained for the pGAD-*mtIR*/pGBDU-3'-*mtIA* and pGAD-3'-*mtIA*/pGBDU-*mtIR* combinations, suggesting a direct interaction between MtlR and the EIIB^{Mtl} domain of MtlA (Fig. 3A). In order to identify the domains of MtlR that interact with EIIB^{Mtl}, we cloned each regulatory domain of MtlR separately into both yeast two hybrid vectors as well as fused either to their upstream or downstream regulatory domain. Subsequent interaction studies revealed that the EIIB^{Mtl} domain of MtlA specifically binds to the fusion protein composed of the two C-terminal EIIB^{Gat}-like/EIIA^{Mtl}-like domains of MtlR, (Fig. 3B), but not to either one of the single domains. Because the EIIB^{Mtl} domain is not phosphorylated in yeast, this result confirms that MtlR interacts with unphosphorylated EIIB^{Mtl}, but does not exclude an interaction with phosphorylated EIIB^{Mtl}. We observed that MtlR also binds to the fused EIIB^{Gat}-like/EIIA^{Mtl}-like domains, suggesting that the two C-terminal domains of MtlR contribute to MtlR oligomerisation (Fig. 3).

Complementation of the $\Delta mtIAFD$ and the $\Delta 3'$ -*mtIA* $\Delta mtIF$ double mutant with $EIIB^{Mtl}$ and $EIIB^{Mtl}$

To confirm the importance of the $EIIB^{Mtl}$ domain for MtlR function we cloned the *B. subtilis xyl* promoter and the Shine-Dalgarno (SD) box of *xylA* (Gärtner *et al.*, 1992) as well as the entire *mtIA* gene into the integrative plasmid pDG1664 (Guérout-Fleury *et al.*, 1996). In the resulting construct *mtIA* is expressed under control of the *xyl* promoter. The ectopic integration of this plasmid into the $\Delta 3'$ -*mtIA* $\Delta mtIF$ double mutant or the triple deletion mutant $\Delta mtIAFD$ indeed restored constitutive expression of the *Pmtl-lacZ* fusion observed in the $\Delta mtIF$ mutant (Fig. 4). Constitutive MtlR activity was also obtained when Cys-396 in the $EIIB^{Mtl}$ domain of MtlA was replaced with Ala, which prevents its phosphorylation. However, when an identical integration was carried out with a pDG1664-derived plasmid carrying only the 3'-*mtIA* fragment encoding the $EIIB^{Mtl}$ domain β -galactosidase activity in the $\Delta mtIAFD$ triple mutant remained very low. The same result was obtained when the 3'-*mtIA*-containing plasmid was integrated into the chromosome of the $\Delta 3'$ -*mtIA* $\Delta mtIF$ double mutant (Fig. 5). Even more surprising, when this plasmid was integrated into the chromosome of strain PJ001, in which MtlR and the mannitol operon are intact, it prevented mannitol-mediated induction of the expression of the *Pmtl-lacZ* fusion (Fig. 5). Moreover, the constitutive synthesis of β -galactosidase in strains HB41 ($\Delta mtIF$) (Fig. 5) or PJ004 ($\Delta mtIF$) (data not shown), PJ007 (*mtlRH342D*) and PJ027 ($\Delta mtIF$, *mtlRC419A*) (Joyet *et al.*, 2010) was prevented when these mutants were transformed with the pDG1664PxylA-3'-*mtIA* plasmid and grown in the presence of xylose, which leads to the synthesis of soluble $EIIB^{Mtl}$ (Fig. 5). In conclusion, the above results establish that in contrast to $EIIB^{Mtl}$ fused to $EIIC^{Mtl}$ the soluble $EIIB^{Mtl}$ domain is apparently not only unable to stimulate MtlR activity but even inhibits MtlR function.

***EIIB^{Mtl}* fused to the integral membrane protein YwqC restores MtlR activity**

One possible explanation for the above described unexpected results was that $EIIB^{Mtl}$ needs to sequester MtlR to the membrane in order to render it active. This activation might be prevented by the overproduction of soluble $EIIB^{Mtl}$, which probably competes with the $EIIB^{Mtl}$ domain fused to MtlA for MtlR binding. In order to test this hypothesis, we cloned the *B. subtilis ywqC* gene lacking the 3'-part encoding the last 34 amino acids, which had been shown to function as modulator of the tyrosine kinase YwqD (PtkA) (Mijakovic *et al.*, 2003), into the *B. subtilis* replicative plasmid pBQ200 (Martin-Verstraete *et al.*, 1994). The cloned DNA fragment codes for a truncated YwqC protein composed of its two trans-membrane helices and a C-terminal cytoplasmic 15 amino acids long tail. By using the His-tag of the pQE30 plasmid as a linker the 3'-*mtIA* fragment was subsequently fused to

the truncated *ywqC* gene and the resulting plasmid was used to transform the $3'$ -*mtIA mtIF* double deletion mutant. Expression of the *ywqC::3'-mtIA* fusion from the constitutive *PdegQ36* promoter in pBQ200 indeed restored full constitutive expression of the *Pmtl-lacZ* fusion in the $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* double mutant (Fig. 6). In contrast, very low MtlR activity was observed when the $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* double mutant was transformed with empty pBQ200 or pBQ200 carrying only the DNA fragment coding for the EIIB^{Mtl} domain. In order to test whether phosphorylation of the EIIB^{Mtl} domain would have an influence on MtlR activation the phosphorylatable Cys-8 of the EIIB^{Mtl} domain (corresponds to Cys-396 in MtlA) was replaced with an Ala or Asp residue in the YwqC-EIIB^{Mtl} fusion protein. β -Galactosidase activity identical to that observed for wild-type EIIB^{Mtl} fused to YwqC was obtained when Cys-8 in the EIIB^{Mtl} domain was replaced with an Ala. In contrast, the $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* mutant transformed with the pBQ200-derived plasmid carrying the Cys-8-Asp mutant allele exhibited 3.2-fold lower MtlR activity (Fig. 6).

Expression of the *ywqC::3'-mtIA* fusion in the $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* mutant probably also restores the synthesis of the membrane-integrated EIIC^{Mtl} domain of MtlA. The question therefore arose whether the EIIC^{Mtl} domain would be necessary for MtlR activation, possibly by interacting with MtlR bound to the EIIB^{Mtl} domain of the fusion protein. In order to answer this question, the pBQ200-derived plasmid carrying the *ywqC::3'-mtIA* fusion was also used to transform the $\Delta mtIAFD$ mutant. In the triple mutant lacking also the EIIC^{Mtl} domain of MtlA synthesis of the YwqC/EIIB^{Mtl} fusion protein restored expression of the *Pmtl-lacZ* fusion to more than half the level observed for the reconstituted $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* double mutant. A similar decrease of β -galactosidase activity in the $\Delta mtIAFD$ mutant compared to the $\Delta 3'$ -*mtIA \Delta mtIF* double mutant was observed with the YwqC/EIIB^{Mtl}Cys8Ala and YwqC/EIIB^{Mtl}Cys8Asp fusion proteins. In conclusion, these results suggest that the EIIC^{Mtl} domain plays only a minor role in *B. subtilis* MtlR activation. Most of the 15- to 20-fold activation of MtlR in the YwqC/EIIB^{Mtl} complementation experiments owes to sequestration of the transcription regulator to the cytoplasmic membrane.

Discussion

In order to control the expression of genes encoding either PTS components catalyzing the uptake and phosphorylation of carbohydrates or catabolic enzymes, many bacteria use regulatory proteins containing PRDs. MtlR of firmicutes is a PRD-containing transcription activator of the mannitol operon. Phosphorylation of MtlR from *G. stearothermophilus* (Henstra *et al.*, 1999) and *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010) by PTS components and the effects of these phosphorylations on MtlR activity

have been extensively studied. We here report an additional new mode of regulation of MtlR from *B. subtilis*. We observed that the constitutive activity of MtlR in an *mtlF* mutant (Joyet *et al.*, 2010) was prevented when in addition either the entire EIICB^{Mtl} or only its EIIB^{Mtl} domain was deleted. MtlR apparently needs EIIB^{Mtl} in order to be active. This was surprising, because the EIIB^{Mtl} domain of MtlA was found to phosphorylate MtlR in the EIIA^{Mtl}-like domain at His-599 and this phosphorylation has a slightly inhibitory effect on MtlR function. Activation of MtlR by EIIB^{Mtl} seems to occur by direct interaction of the two proteins. Yeast two hybrid experiments revealed that EIIB^{Mtl} binds to entire MtlR and more specifically to the C-terminal EIIB^{Gat}-like and EIIA^{Mtl}-like domains of MtlR. Interactions between PTS components for phosphoryl group transfer usually last only for very short time periods and they are therefore not detectable by the yeast two hybrid method, as has been shown for EI and HPr of *B. subtilis* (Poncet *et al.*, 2009). In addition, interactions between EIIA and EIIB domains usually do not require additional domains. Among others, this has been demonstrated for the interaction between the *E. coli* EIIA^{Mtl} and EIIB^{Mtl} domains (Suh *et al.*, 2006). It is therefore likely that the interaction between the EIIB^{Mtl} domain of MtlA and MtlR observed in the yeast two hybrid experiments, which requires also the EIIB^{Gat} domain, differs from the interaction between these two proteins required for MtlR phosphorylation at His-599 in the EIIA^{Mtl}-like domain. It is, however, possible that the two modes of interaction might share a partly overlapping interface and that phosphorylation/dephosphorylation at His-599 and Cys-419 might favour one or the other type of interaction.

Complementation of an *mtlAFD* deletion mutant or of a Δ *mtlF* mutant carrying only a deletion of the EIIB^{Mtl} domain-encoding 3' part of *mtlA* with entire *mtlA* restored the constitutive MtlR activity observed for the *mtlF* mutant. In contrast, complementation of the *mtlAFD* triple deletion mutant or the Δ 3'-*mtlA* Δ *mtlF* mutant with only the EIIB^{Mtl} domain did not restore MtlR activity. Even more surprisingly, synthesis of soluble EIIB^{Mtl} in the wild-type strain prevented mannitol-induced activation of MtlR. Moreover, the soluble EIIB^{Mtl} domain also prevented the constitutive expression of an MtlR-controlled *PmtlA-lacZ* fusion in the Δ *mtlF*, the *mtlR*His342Asp or the Δ *mtlF* *mtlR*Cys419Ala mutant. These results suggest that when the interaction between MtlR and EIIB^{Mtl} occurs in the cytoplasm it is not capable of stimulating the activity of the transcription regulator but rather inhibits it. Apparently, in order to activate MtlR EIIB^{Mtl} needs to be fused to a membrane protein. Under normal conditions the EIIB^{Mtl} domain is fused to the membrane-integrated EIIC^{Mtl} domain. We could demonstrate that fusion of the EIIB^{Mtl} domain to another transmembrane protein, the protein kinase modulator YwqC, also restores MtlR activity in the *mtlAFD* triple deletion mutant and the 3'-*mtlA* *mtlF* double deletion

mutant. EIIB^{Mtl}-mediated MtlR activation does not seem to require an additional interaction of the transcription regulator with the EIIC^{Mtl} domain, because strong stimulation of MtlR activity by the YwqC-EIIB^{Mtl} fusion occurred independently of whether the EIIC^{Mtl} domain was present or not. It is therefore possible that approaching MtlR to the hydrophobic environment of the cytoplasmic membrane is sufficient for its activation. Alternatively, it is possible that MtlR sequestration by the EIIB^{Mtl} domain allows the specific interaction of MtlR with a not yet identified lipid or protein component of the cytoplasmic membrane, which in turn causes MtlR activation (Fig. 7).

Dephosphorylation of MtlR at Cys-419 in the EIIB^{Gat}-like domain owing to the presence of mannitol in the growth medium has been established as a major induction mechanism for the *B. subtilis mtl* operon (Joyet *et al.*, 2010). EIIB^{Mtl}-mediated MtlR sequestration most likely serves as a second induction mechanism. P~EIIB^{Mtl}, which prevails when mannitol is absent, probably has a significantly reduced stimulating effect on MtlR activity compared to unphosphorylated EIIB^{Mtl}. It is therefore mainly unphosphorylated EIIB^{Mtl} that sequesters and stimulates MtlR. But why does *B. subtilis* need two independent induction mechanisms for the *mtl* operon? One possibility is that the two induction mechanisms might be used to lock *mtl* operon expression very tightly in the absence of mannitol. In order to be active, MtlR needs to be phosphorylated at His-342 and dephosphorylated at Cys-419 (Fig. 7). In the absence of mannitol only a few MtlR molecules will remain unphosphorylated at Cys-419 and the *mtl* operon will therefore be barely expressed. By introducing membrane sequestration by the EIIB^{Mtl} domain as a third condition for MtlR activity, even less or maybe none of the MtlR molecules will fulfil the three conditions for being active and consequently the *mtl* promoter will be almost entirely shut down.

Regulation of a PRD-containing protein by membrane sequestration has previously been reported. The *E. coli* BglG antiterminator, which controls the expression of the β -glucoside operon *bgl*, was found to interact with the EIIB^{Bgl} domain of the PTS permease BglF (Lopian *et al.*, 2003). However, although the membrane sequestration of BglG is also used for induction of the *bglGFB* operon, the mechanism described for EIIB-mediated BglG regulation is quite different from that reported here for *B. subtilis* MtlR. First, BglG sequestration by EIIB^{Bgl} leads to inactivation of the antiterminator and not to its activation. Second, in contrast to the mannitol system, the presence of a β -glucoside transported by BglF, such as salicin, prevents the interaction of the EIIB^{Bgl} domain with BglG, which is consequently liberated into the cytoplasm and thereby regains its antitermination activity. Salicin-induced release of BglG from the membrane has been observed after fusing BglG to GFP (Lopian *et al.*, 2003).

A similar membrane sequestration mechanism mediated by the phosphorylation state of an EIIB domain has been reported for the *E. coli* transcription regulator Mlc (Lee *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2000), which is a member of the ROK family proteins and does not contain a PRD. Mlc is a repressor that inhibits the expression of several genes and operons including *ptsHI-crr*, *ptsG* and *manXYZ*. Its activity is regulated by interaction with at least two proteins. One is MtfA, a cytoplasmic enzyme with proteolytic activity (Göhler *et al.*, 2012), the other is the EIIB^{Glc} domain of the glucose-specific PTS transporter PtsG. Both proteins inhibit the Mlc repressor activity in the presence of glucose. Under these conditions the EIIB^{Glc} domain of PtsG is present mainly in unphosphorylated form. Unphosphorylated EIIB^{Glc} interacts with Mlc and leads to its membrane sequestration, which prevents the repressor function of Mlc. The *ptsHI-crr*, *ptsG* and *manXYZ* transcription units are therefore strongly expressed when glucose is present. Similar to what we observed for MtlR activation, it is the EIIB^{Glc}-mediated membrane localization and not the interaction with the EIIB domain of PtsG itself which inactivates Mlc (Tanaka *et al.*, 2004). In the absence of glucose the EIIB^{Glc} domain of PtsG is present mainly in the phosphorylated form, which cannot interact with Mlc. The transcription regulator is therefore released into the cytoplasm and represses the expression of its target operons. In the case of maltotriose utilisation by *E. coli*, the ABC transporter MalFGK₂ sequesters MalT, the PRD-less activator of the maltose regulon, to the membrane in the absence of its substrate (Richet *et al.*, 2012). This leads to inactivation of MalT and therefore prevents expression of the *mal* regulon. When transporting its substrate maltotriose the ABC transporter does not seem to sequester MalT.

Finally, evidence has recently been provided that the PRD-containing regulator ManR, which functions as activator of the operon encoding the main glucose/mannose PTS transporter EIIAB/EIIC/EIID^{Man} of *L. monocytogenes*, needs to interact with EIIB^{Mpo} of another glucose/mannose type PTS in order to be functional (Aké *et al.*, 2011). ManR is also controlled by phosphorylation at two of its four regulatory domains (Xue and Miller, 2007). The inhibitory phosphorylation at the PRD2 domain is probably catalyzed by EIIB^{Mpo}. Similar to what we observed for *B. subtilis* MtlR, deletion of only EIIA^{Mpo} therefore caused constitutive ManR activity. However, deletion of only EIIB^{Mpo} or both PTS components caused a loss of ManR function, clearly establishing that ManR requires unphosphorylated EIIB^{Mpo} for its activity. Complementation of the $\Delta mpoA \Delta mpoB$ double mutant with wild-type *mpoB* or the *mpoB*(H14A) allele expressed from a plasmid restored ManR activity (Aké *et al.*, 2011). The *L. monocytogenes* EIIB^{Mpo} is a soluble, cytoplasmic protein, which nevertheless interacts with the membrane-integrated EIIC^{Mpo} and EIID^{Mpo} components for glucose/mannose

transport and phosphorylation. However, it is likely that the majority of the EIIB^{Mpo} molecules are located in the cytoplasm and that in this case it might not be membrane sequestration but rather interaction with EIIB^{Mpo} that stimulates the activity of the transcription activator ManR. In conclusion, the above examples clearly demonstrate that there exists a great variability of EIIB-mediated regulation of transcription activators and repressors.

Experimental Procedures

Bacterial strains and growth conditions

The *B. subtilis* strains used in this study are listed in Table 1. They were grown in Luria Bertani (LB) medium or LB medium containing 1% mannitol as well as the appropriate antibiotics. *B. subtilis* strains containing pDG1644-Pxyl-derived plasmids were grown in LB medium containing also 0.2% xylose. LB medium supplemented with appropriate antibiotics (4 µg/ml chloramphenicol, 100 µg/ml spectinomycin, 5 µg/ml kanamycin or 0.5 µg/ml erythromycin) was also routinely used for selection of transformants. *E. coli* strain NM522 (Gough and Murray, 1983) was used for cloning experiments with the various plasmids used in this study. Selection of *E. coli* transformants was carried out by using 100 µg/ml ampicillin or 50 µg/ml kanamycin.

Construction of the B. subtilis Δ3'-mtIA, Δ3'-mtIA/ΔmtIF and ΔmtIAFD mutants.

Introduction of the *mtIF* deletion in strain PJ002 has previously been described (Joyet *et al.*, 2010). An identical approach was used to introduce the *mtIF* deletion, the 3'-*mtIA* *mtIF* double deletion and the *mtIAFD* triple deletion in strain PJ001. DNA fragments of 0.8 kb corresponding to the upstream and downstream regions of 3'-*mtIA*/*mtIF* and *mtIAFD* were amplified by using *B. subtilis* BSB168 chromosomal DNA as template and appropriate primers (Table 2). The PCR fragments were inserted upstream and downstream from the kanamycin resistance cassette present in the vector pGEM-T(aphA3), the construction of which has previously been described (Joyet *et al.*, 2010). The resulting plasmids and the previously constructed plasmid pGEM-TmtIFup(aphA3)mtIFdown were used to transform strain PJ001, which contains the gene for wild-type MtlR and a *PmtI-lacZ* fusion inserted at the *amyE* locus (Joyet *et al.*, 2010) providing the Δ*mtIF* (HB41), the Δ3'-*mtIA* Δ*mtIF* double (HB40) and the Δ*mtIAFD* triple mutant (HB42) (Table 1). In order to construct a 3'-*mtIA* (EIIB^{Mtl} domain) deletion mutant the region upstream from 3'-*mtIA* and the entire *mtIF* gene together with the 5' part of *mtID* were amplified by PCR using genomic DNA as template and the primer pairs BamHIDirEIIC and RevEIICjoncBglIIIMtIF as well as DirEIICjoncBglIIIMtIF and RevHindIIIMtID (Table 2). The two PCR

products served as template in a second PCR with only the distal primers BamHIDirEIIIC and RevHindIIIMtIID. The resulting DNA fragment was cloned into pMAD Δ HindIII (Joyet *et al.*, 2010) and the pMAD-derived plasmid was used to transform the $\Delta 3'$ -*mtIA* Δ *mtIF* double mutant HB40 thus providing the $\Delta 3'$ -*mtIA* mutant. In all mutants deletion of the correct DNA fragments was verified by PCR followed by DNA sequencing.

Construction of vectors used for complementation assays

The integrative plasmid pDG1664 (Guérout-Fleury *et al.*, 1996), which contains two sequences for insertion at the threonine locus of the *B. subtilis* genome, was used for complementation of the Δ *mtIF*/ $\Delta 3'$ -*mtIA* and Δ *mtIAFD* mutants with entire *MtIA* or with only the EIIB^{MtI} domain of *MtIA*. In a first step, the *B. subtilis xyl* promoter together with the Shine Dalgarno box preceding the *xylA* gene were amplified by PCR using chromosomal DNA of strain BSB168 as template and appropriate primers (Table 2). The resulting small DNA fragment was cut with BamHI and NdeI and cloned into pDG1664 cut with the same enzymes providing pDG1664-Pxyl. The entire *mtIA* gene or its 3'-part coding for the EIIB^{MtI} domain were subsequently amplified by PCR using chromosomal DNA of strain BSB168 as template and primers introducing an NdeI site at the 5'-end and an EcoRI site at the 3'-end. The start codon of the EIIB^{MtI} domain was chosen in such a way that the phosphorylatable Cys was located in position 8, which corresponds to its natural position in the EIIB proteins of lactose class PTS (between amino acids 7 and 9) (Finkeldei and Hengstenberg, 1991). The resulting DNA fragments were cut with the corresponding restriction enzymes and cloned into plasmid pDG1664-Pxyl cut with the same enzymes, thus allowing their expression from the *xyl* promoter. In order to obtain the *mtIA*-Cys/Ala allele we made use of a BglII restriction site located next to the Cys codon. We first needed to delete a BglII site in the vector pDG1644. For that purpose the pDG1664-Pxyl-*mtIA* plasmid was cut with MscI/EcoRV in order to remove the BglII site, the *bla* gene and the origin of replication present on a 2145 bp fragment. We subsequently complemented MscI/EcoRV-cut pDG1664-Pxyl-*mtIA* with the origin of replication of pACYC184, which was obtained by digesting this vector with PvuII and EcoRV. The resulting plasmid was used as template for the amplification of a DNA fragment with the primers XylAproBam and r-EIIB-alaBglII, which leads to the Cys/Ala replacement in EIIB^{MtI} encoded by the 3'-*mtIA* part. The amplified fragment was cut with BamHI and BglII and used to replace the corresponding region in the above plasmid thus providing pDG1664-Pxyl-*mtIA*Cys/Ala. The pDG1664-derived plasmids carrying the various 3'-*mtIA* and *mtIA* alleles were integrated by double crossover into the *thrC* locus of the Δ *mtIF*/ $\Delta 3'$ -*mtIA* and Δ *mtIAFD* mutants. The

correct insertion was confirmed by appropriate PCR amplification. The pDG1664-derived plasmid containing the 3'-part of *mtIA* was also integrated into strain HB41, PJ001, PJ004, PJ007 and PJ027, which each contains the *Pmtl-lacZ* fusion inserted at the *amyE* locus and either wild-type *mtIR*, *mtIRH342D* or *mtIRC419A*; PJ004 and the latter strain also contains a deletion of *mtIF* (Joyet *et al.*, 2010).

Construction of the *ywqC::3'-mtIA* fusion

The *B. subtilis* replicative plasmid pBQ200, which is a pHT315 derivative (Arantes and Lereclus, 1991) carrying the constitutive promoter *PdegQ36* (Martin-Verstraete *et al.*, 1994) was used for the construction of the *ywqC::3'-mtIA* fusion. In a first step a DNA fragment coding for a truncated YwqC lacking the last 34 amino acids together with its Shine Dalgarno box was amplified by PCR using chromosomal DNA of *B. subtilis* BSB168 as template and primers YwqCForBam and YwqCRevSal (Table 2) introducing BamHI and Sall restriction sites at the 5'- and 3'-ends, respectively. The amplified DNA was cut with the corresponding restriction enzymes and cloned into pBQ200 digested with the same enzymes providing plasmid pBQ200-ywqC. In the second step the 3'-*mtIA* fragment was amplified by using genomic DNA of *B. subtilis* BSB168 as template and the primer pair EIIBBam and r-EIIBsall. In order to obtain the Cys-8-Ala and Cys-8-Asp 3'-*mtIA* alleles (Cys-8 corresponds to Cys-396 in entire MtlA) the mutagenic primers EIIBalaBam or EIIBaspBam, respectively, were used instead of EIIBBam. The three amplified DNA fragments were cloned into pQE30 cut with the corresponding restriction enzymes. The pQE30 inserts were subsequently amplified by PCR by using primers EIIBMtlForSal and EIIBMtlRevSph (Table 2) introducing Sall and SphI restriction sites at the 5'- and 3'-ends, respectively. The obtained PCR fragment contained the pQE30 start codon and the codons for the His-tag, which were kept in order to function as a spacer between YwqC and the EIIB^{Mtl} domain. The amplified DNA fragments were cut with the corresponding restriction enzymes and cloned into pBQ200-ywqC digested with the same enzymes providing the three plasmids pBQ200-ywqC-3'-*mtIA*, pBQ200-ywqC-3'-*mtIA*(Cys/Ala) and pBQ200-ywqC-3'-*mtIA*(Cys/Asp). The correct sequence and in frame fusion of the inserts was verified and the plasmids were used to transform the $\Delta mtIF/\Delta 3'-mtIA$ and $\Delta mtIAFD$ mutants. For a control experiment the 3'-*mtIA* fragment preceded by the Shine Dalgarno box of *xyIA* was amplified by using plasmid pDG1664-*xyI-3'-mtIA* as template and the amplified DNA fragment was cloned into empty pBQ200.

Yeast two hybrid experiments

The entire *B. subtilis mtlR* gene, the DNA fragments encoding the four regulatory domains of MtlR and each regulatory domain fused to its upstream or downstream domain as well as the 3'-*mtIA* DNA fragment encoding the EIB^{Mtl} domain were PCR-amplified by using the appropriate primers listed in Table 2. All obtained PCR products contained a BamHI restriction site at the 5'-end and a Sall site at the 3'-end. They were cloned into both, the bait vector pGBDU (URA3) and the prey vector pGAD (LEU2), which were cut with the same enzymes. The bait constructs were introduced in the *Saccharomyces cerevisiae* strain PJ69-4a and the prey constructs in strain PJ69-4 α (James *et al.*, 1996). The correct DNA sequence of all cloned fragments was confirmed by DNA sequencing. The plasmids were used to transform the two yeast strains, which for mating were grown in rich YEPD medium. Diploids obtained were selected for an interaction phenotype by growing them in synthetic complete medium (SC) lacking the appropriate amino acids (Leu, Trp, His) or nucleotides (Ade, Ura) (Guthrie and Fink, 1991). An interaction of the two proteins encoded by the inserts of the pGBDU and pGAD vectors was indicated by growth of the corresponding *S. cerevisiae* strain. False-positive interactions generated by the yeast two-hybrid system were eliminated experimentally as previously described (Noirot-Gros *et al.*, 2002).

RNA isolation and qRT-PCR

The *B. subtilis* wild-type strain was grown to exponential phase in LB medium with and without mannitol and the $\Delta mtIF$ and $\Delta 3'-mtIA \Delta mtIF$ mutants were grown only in LB medium. Cells from 30 ml cultures were collected by centrifugation and RNA was extracted using the RNeasy mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Residual DNA was removed using the Turbo DNA-free kit (Ambion). The quality of the RNA preparation was tested with an Agilent Bioanalyzer before RT reactions were performed using random hexamers (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. qRT-PCR experiments were carried out with the LightCycler (Roche) using primers specific for the *lacZ* gene and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) by following the protocol of LightCycler Faststart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche). Data were processed with the Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software. In order to normalize transcript levels the constitutively expressed *rpoB* gene was used as a reference (Milohanic *et al.*, 2003). Statistical analyses of the data were carried out with the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

β-Galactosidase assays

β-Galactosidase activity in toluenized *B. subtilis* cells was measured as previously described (Miller, 1972). In short, 3 ml of LB medium containing appropriate antibiotics and either no carbohydrate, 1% mannitol or 0.2% xylose (for strains containing *mtIA* or 3'-*mtIA* fused to *P_{xyI}*) were inoculated with 200 μl of an overnight culture and grown for 4 hours at 37°C before an aliquot of 1 ml was withdrawn. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 500 μl of Z buffer and permeabilized with toluene. β-Galactosidase assays were performed with o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside as substrate and the change of the absorption at 420 nm (A_{420}) was continuously followed with a Kontron Bio-Tek spectrophotometer using the "Aurate" program. The specific activity is expressed as ΔA_{420} per min and μg protein. Protein concentrations were determined by using the protein-dye binding method with Commassie Brilliant Blue (Bradford, 1976).

Acknowledgements

We thank Meriem Derkaoui and Sandrine Poncet for useful discussions.

References

- Aké, F.M., Joyet, P., Deutscher, J., and Milohanic, E. (2011) Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **81**: 274-293.
- Arantes, O., and Lereclus, D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**: 115-119.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- De Boeck, R., Sarmiento-Rubiano, L.A., Nadal, I., Monedero, V., Pérez-Martínez, G., and Yebra, M.J. (2010) Sorbitol production from lactose by engineered *Lactobacillus casei* deficient in sorbitol transport system and mannitol-1-phosphate dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1915-1922.
- Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M.H., Jr., and Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 3336-3344.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Finkeldei, U., and Hengstenberg, W. (1991) Staphylococcal lactose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: site-specific mutagenesis on the *lacE* gene gives evidence that a cysteine residue is responsible for phosphorylation. *Protein Eng* **4**: 475-478.
- Fischer, R., Pogge von Strandmann, R., and Hengstenberg, W. (1991) Mannitol-specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Enterococcus faecalis*: molecular cloning and nucleotide sequences of the Enzyme III^{Mtl} gene and the mannitol-1-phosphate dehydrogenase gene, expression in *Escherichia coli*, and comparison of the gene products with similar enzymes. *J Bacteriol* **173**: 3709-3715.
- Gärtner, D., Degenkolb, J., Ripperger, J.A., Allmansberger, R., and Hillen, W. (1992) Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the *xyl* operator and the inducer xylose. *Mol Gen Genet* **232**: 415-422.
- Göhler, A.K., Staab, A., Gabor, E., Homann, K., Klang, E., Kosfeld, A., Muus, J.E., Wulftange, J.S., and Jahreis, K. (2012) Characterization of MtfA, a novel regulatory output signal protein of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **194**: 1024-1035.
- Gough, J.A., and Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**: 1-19.

- Guérout-Fleury, A.M., Frandsen, N., and Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**: 57-61.
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* **194**: 3-21.
- Henstra, S.A., Tolner, B., ten Hoeve Duurkens, R.H., Konings, W.N., and Robillard, G.T. (1996) Cloning, expression, and isolation of the mannitol transport protein from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **178**: 5586-5591.
- Henstra, S.A., Tuinhof, M., Duurkens, R.H., and Robillard, G.T. (1999) The *Bacillus stearothermophilus* mannitol regulator, MtlR, of the phosphotransferase system. A DNA-binding protein, regulated by HPr and IICB^{mtl}-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* **274**: 4754-4763.
- Henstra, S.A., Duurkens, R.H., and Robillard, G.T. (2000) Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J Biol Chem* **275**: 7037-7044.
- Heravi, K.M., Wenzel, M., and Altenbuchner, J. (2011) Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors. *Microb Cell Fact* **10**: 83.
- Jacobson, G.R., Lee, C.A., Leonard, J.E., and Saier, M.H., Jr. (1983) Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. I. Properties of the purified permease. *J Biol Chem* **258**: 10748-10756.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S., and Deutscher, J. (2010) Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol Microbiol* **76**: 1279-1294.
- Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P., and Plumbridge, J. (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* **19**: 5353-5361.
- Lopian, L., Nussbaum-Shochat, A., O'Day-Kerstein, K., Wright, A., and Amster-Choder, O. (2003) The BglF sensor recruits the BglG transcription regulator to the membrane and releases it on stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7099-7104.
- Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1994) Interaction of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J Mol Biol* **241**: 178-192.

- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Maréchal, P., and Deutscher, J. (2003) Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J* **22**: 4709-4718.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**: 1613-1625.
- Mustachio, L.M., Aksit, S., Mistry, R.H., Scheffler, R., Yamada, A., and Liu, J.M. (2012) The *Vibrio cholerae* mannitol transporter is regulated posttranscriptionally by the MtlS small regulatory RNA. *J Bacteriol* **194**: 598-606.
- Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, J.H., Jeong, J.Y., Lee, J.H., Roe, J.H., Peterkofsky, A., Kang, S.O., Ryu, S., and Seok, Y.-J. (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB^{Glc} recruits the global repressor Mlc. *EMBO J* **20**: 491-498.
- Noirot-Gros, M.F., Dervyn, E., Wu, L.J., Mervelet, P., Errington, J., Ehrlich, S.D., and Noirot, P. (2002) An expanded view of bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8342-8347.
- Oddo, E., Saiano, F., Alonzo, G., and Bellini, E. (2002) An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the oleaceae growing in northern Sicily. *Ann Bot* **90**: 239-243.
- Poncet, S., Soret, M., Mervelet, P., Deutscher, J., and Noirot, P. (2009) Transcriptional activator YesS is stimulated by histidine-phosphorylated HPr of the *Bacillus subtilis* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **284**: 28188-28197.
- Reiche, B., Frank, R., Deutscher, J., Meyer, N., and Hengstenberg, W. (1988) Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: purification and characterization of the mannitol-specific enzyme III^{mtl} of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus carnosus* and homology with the Enzyme II^{mtl} of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**: 6512-6516.
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Wu, L.-F., Deutscher, J., Reddy, P., and Saier, M.H., Jr. (1992) Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 9158-9169.
- Richet, E., Davidson, A.L., and Joly, N. (2012) The ABC transporter MalFGK₂ sequesters the MalT transcription factor at the membrane in the absence of cognate substrate. *Mol Microbiol* **85**: [Epub ahead of print].
- Suh, J.Y., Cai, M., Williams Jr, D.C., and Clore, G.M. (2006) Solution structure of a post-transition state analog of the phosphotransfer reaction between the A and B cytoplasmic domains of the

- mannitol transporter II^{Mannitol} of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 8939-8949.
- Tan, K., Clancy, S., Borovilos, M., Zhou, M., Hörer, S., Moy, S., Volkart, L.L., Sassoon, J., Baumann, U., and Joachimiak, A. (2009) The mannitol operon repressor MtlR belongs to a new class of transcription regulators in bacteria. *J Biol Chem* **284**: 36670-36679.
- Tanaka, Y., Kimata, K., and Aiba, H. (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J* **19**: 5344-5352.
- Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K., and Aiba, H. (2004) Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **53**: 941-951.
- Watanabe, S., Hamano, M., Kakeshita, H., Bunai, K., Tojo, S., Yamaguchi, H., Fujita, Y., Wong, S.L., and Yamane, K. (2003) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtID) is required for mannitol and glucitol assimilation in *Bacillus subtilis*: possible cooperation of *mtl* and *gut* operons. *J Bacteriol* **185**: 4816-4824.
- Xue, J., and Miller, K.W. (2007) Regulation of the *mpt* operon in *Listeria innocua* by the ManR protein. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5648-5652.

Table 1. *B. subtilis* strains used in this study.

Strains	Genotype or Structure ^a	Phenotype	Source
BSB168	<i>trpC2</i>	Trp-prototrophe	Laboratory strain
HB40	PJ001 tf with pGEM-T(3'- <i>mtlA</i> upstream- <i>aphA3-mtlF</i> downstream), $\Delta 3'$ - <i>mtlA</i> Δ <i>mtlF</i>	Cm ^r Kan ^r	This study
HB41	PJ001 tf with pGEM-T(<i>mtlF</i> upstream- <i>aphA3-mtlF</i> downstream), Δ <i>mtlF</i>	Cm ^r Kan ^r	This study
HB42	PJ001 tf with pGEM-T(<i>mtlA</i> upstream- <i>aphA3-mtID</i> downstream), Δ <i>mtlAFD</i>	Cm ^r Kan ^r	This study
HB47	HB40 tf with pMAD Δ HindIII(5' <i>mtlA</i> upstream- <i>mtlF-mtID</i> downstream), $\Delta 3'$ - <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB 51	HB42 tf with pDG1664- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB 53	HB40 tf with pDG1664- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB54	HB42 tf with pDG1664- <i>mtlACys-Ala</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB56	HB40 tf with pDG1664-3'- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB61	HB40 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB63	HB42 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB65	HB40 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlACys-Asp</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB66	HB40 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlACys-Ala</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB67	HB42 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlACys-Asp</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB68	HB42 tf with pBQ200ywqC::3'- <i>mtlACys-Ala</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB71	HB40 tf with pBQ200	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB72	HB40 tf with pBQ200-SDxylA-3'- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
HB73	HB42 tf with pBQ200	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study

HB74	HB42 tf with pBQ200-SD _{xylA} -3'- <i>mtlA</i>	Cm ^r Kan ^r Erm ^r	This study
PJ001	BSB168 tf with pDG1661Pmtl-lacZ; <i>amyE</i> :: (<i>Cm-Pmtl-lacZ</i>)	Cm ^r	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ002	PJ001 tf with PCR-amplified DNA comprising <i>mtlR</i> (Δ PRD1-PRD2-EIIB ^{Gat} -EIIA ^{Mtd}):: <i>spec</i>	Spec ^r	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ004	PJ002 tf with pGEM-T(<i>mtlF</i> upstream- <i>aphA3</i> - <i>mtlF</i> downstream), Δ <i>mtlF</i>		
PJ007	PJ002 tf with pMAD Δ HindIII- <i>mtlRH342D</i>	Cm ^r Spec ^r Erm ^r	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)
PJ027	PJ004 tf with pMAD Δ HindIII- <i>mtlRC419A</i> , <i>mtlF</i>	Cm ^r Spec ^r Kan ^r Erm ^r	(Joyet <i>et al.</i> , 2010)

^a tf stands for transformed

Table 2. Primers used in this study.

Name	Séquence in 5'-3' direction ^a	Utilisation ^b
DamonMtlSphI	ACGATT <u>GCATG</u> CGCAGTGCAGGTTTAATTCAGC	Δ <i>mtIAFD</i>
RamonMtlSacII	ATCGAT <u>CCGCGG</u> ACTTTGGCACATGACTGTGAC	Δ <i>mtIAFD</i>
DavalMtlSpeI	ACGTACA <u>CTAGT</u> GACCACCCGTGACACAATGTC	Δ <i>mtIAFD</i>
RavalMtlSall	ATGCTAG <u>TCGACA</u> AATGTCGCGTGTGTTTGATGCC	Δ <i>mtIAFD</i>
RamontEIIBA-SacII	ATCGAT <u>CCGCGG</u> CCTGGCTTTTCTTCCCCTTCATGG	Δ 3'- <i>mtIA</i> Δ <i>mtIF</i>
DamontEIIBA-SphI	ACGATT <u>GCATG</u> CTTGGGGTGATTGTAGGATCGG	Δ 3'- <i>mtIA</i> Δ <i>mtIF</i>
DavalEIIBA-SpeI	ACGTACA <u>CTAGT</u> ATGATCGCCTTACATTTCCGGTGCG	Δ 3'- <i>mtIA</i> Δ <i>mtIF</i>
RavalEIIBA-Sall	ATGCTAG <u>TCGAC</u> CCCGCACACCTCTGAAGTACGCCG	Δ 3'- <i>mtIA</i> Δ <i>mtIF</i>
BamHIDirEIIIC	CGC <u>GGATC</u> CTTAGGCGCAATGATTATGGGTCC	Δ 3'- <i>mtIA</i>
RevEIIcJoncBglIIIMtIF	CATGACAAT <u>AGATCT</u> CTTTCTATAAGATTATGCTGCTTGGCTTTTC TTCCC	Δ 3'- <i>mtIA</i>
DirEIIcJoncBglIIIMtIF	TAATCTTATAGAAAG <u>AGATCT</u> ATTGTCATGCAAGTACTCG	Δ 3'- <i>mtIA</i>
RevHindIIIMtID	GG <u>AAGCTT</u> AGATAGTCACCAGTTTCAAGC	Δ 3'- <i>mtIA</i>
EIIBBam	CCT <u>GGATCC</u> ATGAACAAAATTATCTTTGCGTGTGATG	3'- <i>mtIA</i> YTH vectors ^b
r-EIIBsall	CTC <u>GTCGAC</u> TATAAGATTACTTTTTTCAG	3'- <i>mtIA</i> YTH vectors
BsMtlRPRD1F	ATGG <u>GATCC</u> GTTGTCAGCAAAGGTGAGCTG	PRD1 YTH vectors
BsMtlRPRD1R	CGC <u>GTCGAC</u> TTCTGTTTTGTATTTTCGATTGG	PRD1 YTH vectors
BsMtlRPRD2R	CAC <u>GTCGAC</u> TTCTTCTTTTTGATTTCAAGAGC	PRD2 YTH vectors
BsMtlRPRD2F	AA <u>GGATCC</u> TACAAAGCGCAGGAAATTGAGC	PRD2 YTH vectors
BsMtlREIIBF	AA <u>GGATCC</u> GCAAAGTGAAAGCGCTTGTCG	EIIB ^{Gat} YTH vectors
BsMtlREIIBR	GCG <u>GTCGAC</u> ATCTTGATAACTCCATATACC	EIIB ^{Gat} YTH vectors
BsMtlREIIAF	ATC <u>GGATCC</u> GTTCTGCGCCATTTTACGCTAG	EIIA ^{Mtl} -like YTH vectors
BsMtlREIIAR	CAAG <u>TCGAC</u> GACGTGTGCCATGCAGGTTTACAG	EIIA ^{Mtl} -like YTH vectors

XylAproBam	GAAG <u>GATCC</u> CTTTATTATATATCTAATGTGTTTC	<i>xyI</i> promotor + SD box
r-XylAproNdeI	GAGATTGAGCC <u>CATATG</u> ATTTCCCCCTTAA	<i>xyI</i> promotor + SD box
EIIBNdeI	TGAAC <u>CATATGA</u> ACAAAATTATCTTTGCGTGTGATG	pDG1644-3'- <i>mtIA</i>
EIIBNdeI-Ala	TGAAC <u>CATATGA</u> ACAAAATTATCTTTGCG GCT GATGCGGGAATGG	pDG1644-3'- <i>mtIACys/Ala</i>
EIIBNdeI-Asp	TGAAC <u>CATATGA</u> ACAAAATTATCTTTGCG GAT GATGCGGGAATGG	pDG1644-3'- <i>mtIACys/Asp</i>
r-EIIBEco	CTC <u>GAA</u> TTCTATAAGATTACTTTTTTCAG	pDG1644-3'- <i>mtIA</i> alleles and pDG1644- <i>mtIA</i>
D-EIICNdeI	TTTAC <u>CATATGC</u> AGCAGCAAGAACAGCAGCAAGG	pDG1644- <i>mtIA</i>
r-EIIB-alaBglI	GATGGAT <u>GCCCCATGGC</u> ACTTGATCCCATTCCCGCATC AGCCGC AAAG	pDG1644- <i>mtIACys/Ala</i>
YwqCForBam	GATG <u>GGATCC</u> GAGATAAGGAGGTATCATGGGAGAATCTAC	pBQ200-ywqC
YwqCRevSal	TTTT <u>GTCGAC</u> ATTCGCAATGGTGGAAACTGTCCC	pBQ200-ywqC
EIIBBam	CCT <u>GGATCC</u> ATGAACAAAATTATCTTTGCGTGTGATG	pQE30-3'- <i>mtIA</i>
EIIBaspBam	CCT <u>GGATCC</u> ATGAACAAAATTATCTTTGCG GAT GATGCGGGAAT GG	pQE30-3'- <i>mtIACys/Asp</i>
EIIBalaBam	CCT <u>GGATCC</u> ATGAACAAAATTATCTTTGCG GCT GATGCGGGAATG G	pQE30-3'- <i>mtIACys/Ala</i>
r-EIIBsall	CTC <u>GTCGACT</u> TATAAGATTACTTTTTTCAG	pQE30-3'- <i>mtIA</i> alleles
EIIBMtlForSal	GAGAG <u>TCGACC</u> ATCACCATCACCATCACGG	pBQ200-ywqC-3'- <i>mtIA</i> alleles
EIIBMtlRevSph	GGCT <u>GCATGCC</u> GACTATAAGATTACTTTTTTC	pBQ200-ywqC-3'- <i>mtIA</i> alleles

^aRestriction sites are underlined, mutated codons are written in bold letters

YTH vectors stands for the pGBDU and pGAD plasmids

Fig. 1

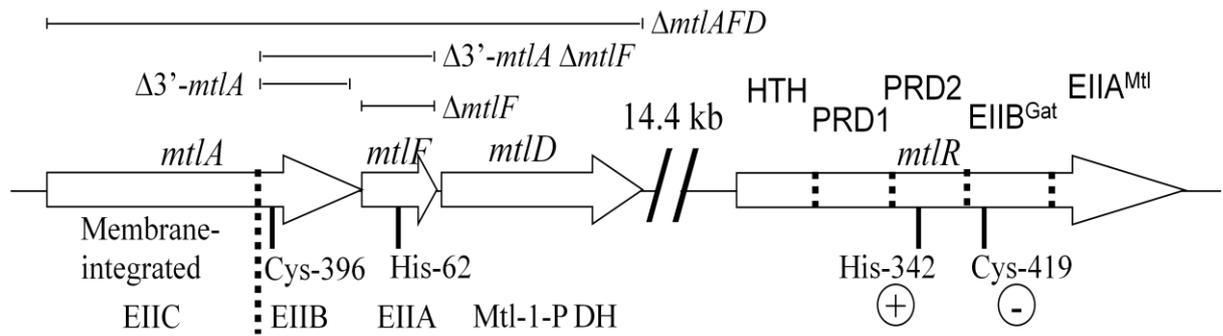


Fig. 1. Schematic presentation of the *B. subtilis* *mtlAFD* operon, the various deletion mutants constructed during this study, the domain structure of MtlA and MtlR and the His and Cys phosphorylation sites in MtlR and the mannitol-specific PTS components.

Fig. 2

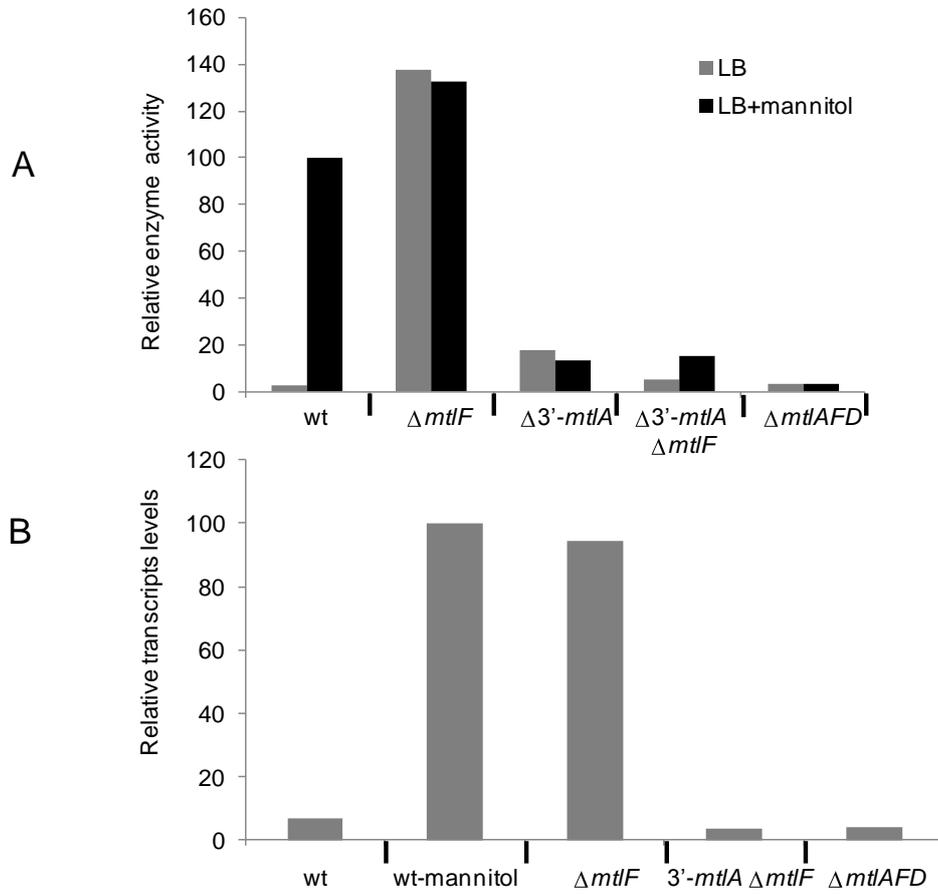


Fig. 2. Expression of the *Pmtl-lacZ* fusion in *B. subtilis* strain PJ001 (wt) and various isogenic *mtl* mutants derived from it. β -Galactosidase activity in the induced wild-type strain was set to 100. For each strain, β -galactosidase activity was measured in cells grown either in the absence (black bars) or presence of mannitol (grey bars). The mean values from at least three independent experiments are presented. The standard deviation in all experiments was less than 15%.

Fig. 3

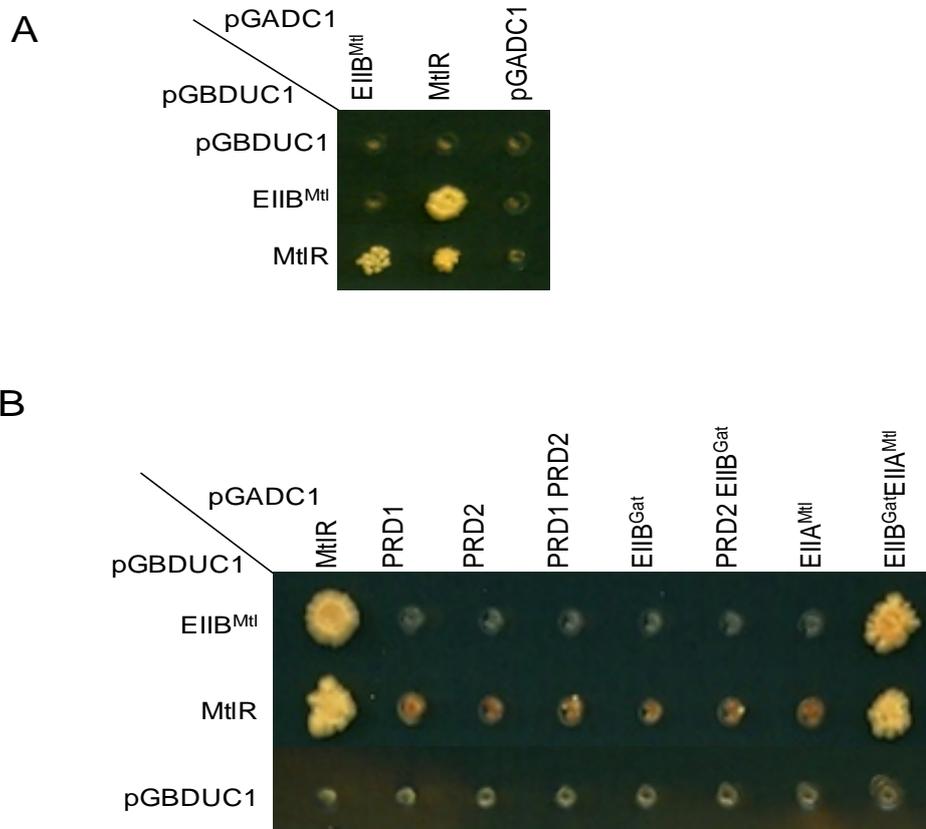


Fig. 3. Yeast two hybrid experiments with the EIIB^{Mtl} domain and either (A) entire MtlR or (B) the four regulatory domains of MtlR as well as with each regulatory domain fused to its neighbouring domain.

A. Full length EIIB^{Mtl} and MtlR were fused with the Gal4 DNA-binding domain (BD) and the Gal4 activation domain (AD). Independent yeast colonies containing the BD fusion proteins were arrayed, mated with the strains expressing the different AD fusion proteins, and diploid cells were subjected to selection for the expression of the HIS3 interaction reporters. Interaction phenotypes on SC-LUH selective plates after incubation at 30°C for 14 days are shown. A weak interaction occurs between MtlR molecules and a stronger interaction between EIIB^{Mtl} and MtlR, whereas EIIB^{Mtl} does not interact with itself.

B. An identical experiment was carried out by fusing EIIB^{Mtl} to the Gal4 DNA-binding domain (BD) and entire MtlR, PRD1, PRD2 and the EIIB^{Gat}-like and EIIA^{Mtl}-like domains of MtlR as well as each regulatory domain fused to its neighbouring domain to the Gal4 activation domain (AD). The other conditions were as described under (A). The interaction between EIIB^{Mtl} and MtlR was confirmed and

a new specific interaction between EIIB^{Mtl} and the fused EIIB^{Gat}-like/EIIA^{Mtl}-like domains was detected.

Fig. 4

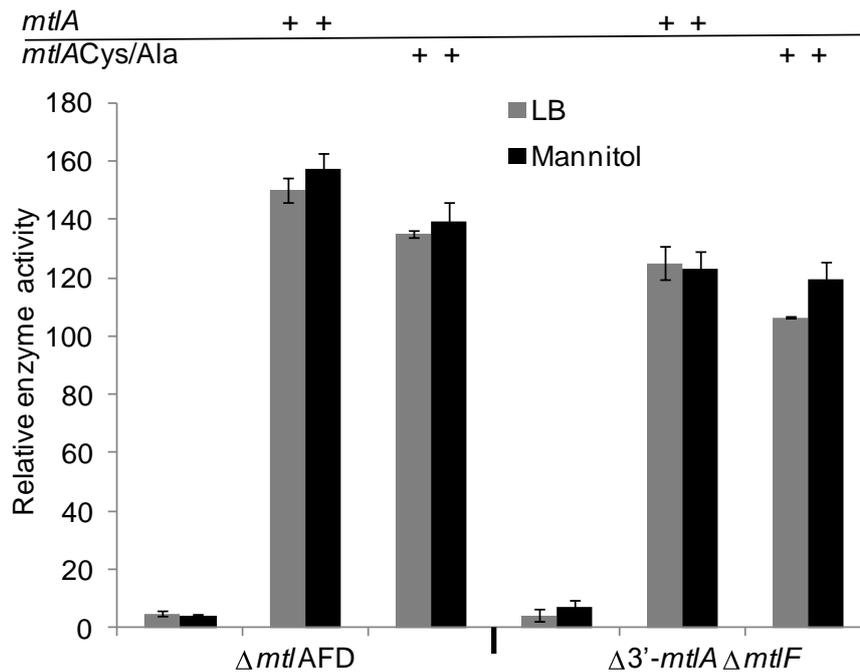


Fig. 4. Expression of the *PmtI-lacZ* fusion in *B. subtilis* $\Delta 3'-mtIA \Delta mtIF$ and $\Delta mtIAFD$ mutants and the same strains complemented with wild-type *mtIA* or *mtIA(Cys396Ala)*. β -Galactosidase activity is presented relative to that measured with the induced wild-type strain PJ001 (Fig. 2), which was set to 100. For each strain, β -galactosidase activity was measured in cells grown either in the absence of mannitol (black bars) or in its presence (grey bars). The mean values from at least three independent experiments are presented. The standard deviation was always less than 15%.

Fig. 5

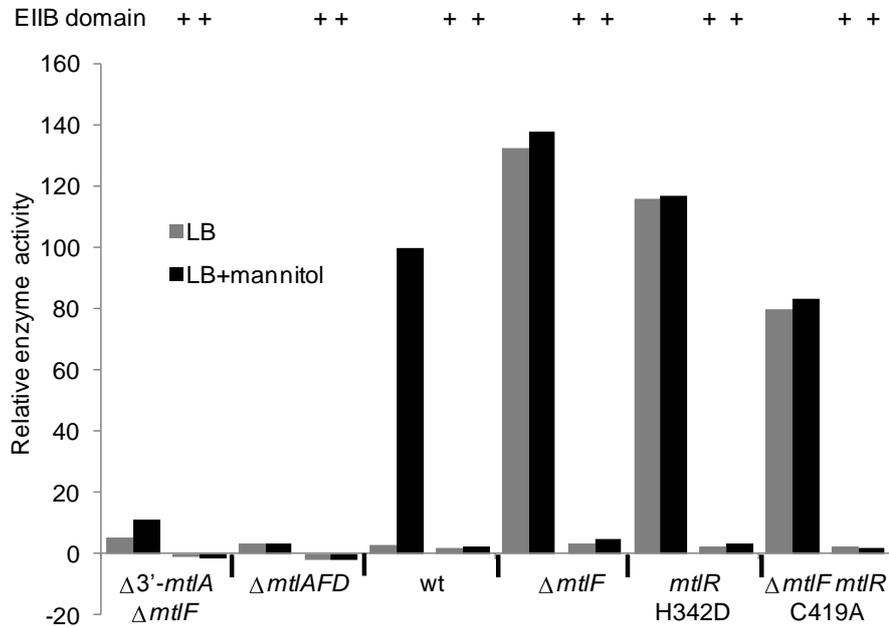


Fig. 5. The effect of the synthesis of the soluble EII^{B^{Mtl}} domain on the expression of a *Pmtl-lacZ* fusion in various *B. subtilis* *mtlR*, *mtlA* and *mtlF* mutants. The relative β -galactosidase activity was based on the activity measured with the induced wild-type strain PJ001 (wt), which was set to 100. For each strain, β -galactosidase activity was measured in cells grown either in the absence (black bars) or presence of mannitol (grey bars). The mean values from at least three independent experiments are presented. The standard deviation was always less than 15%.

Fig. 6

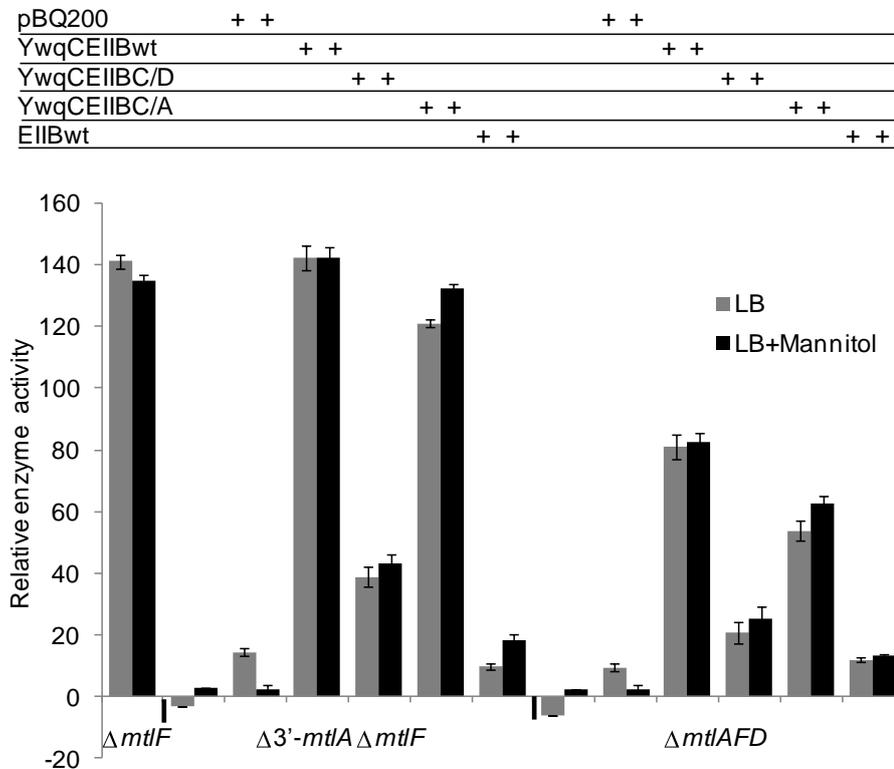


Fig. 6. Expression of the *Pmtl-lacZ* fusion in the *B. subtilis* $\Delta 3'-mtlA \Delta mtlF$ and $\Delta mtlAFD$ mutants and the same strains complemented with the wild-type domain of EIIB^{Mtl}, the (Cys8Asp) or the Cys8Ala mutant domain fused to the cytosolic C-terminus of the *B. subtilis* trans-membrane protein YwqC (Cys-8 in the EIIB^{Mtl} domain corresponds to Cys-396 in MtlA). β -Galactosidase activity was also measured in crude extracts of the $\Delta mtlF$ mutant and it is expressed relative to the induced wild-type strain PJ001 (Fig. 2), which was set to 100. For each strain, β -galactosidase activity was measured in cells grown either in the absence (black bars) or presence of mannitol (grey bars). The mean values from at least three independent experiments are presented. The standard deviation was always less than 15%.

Fig. 7

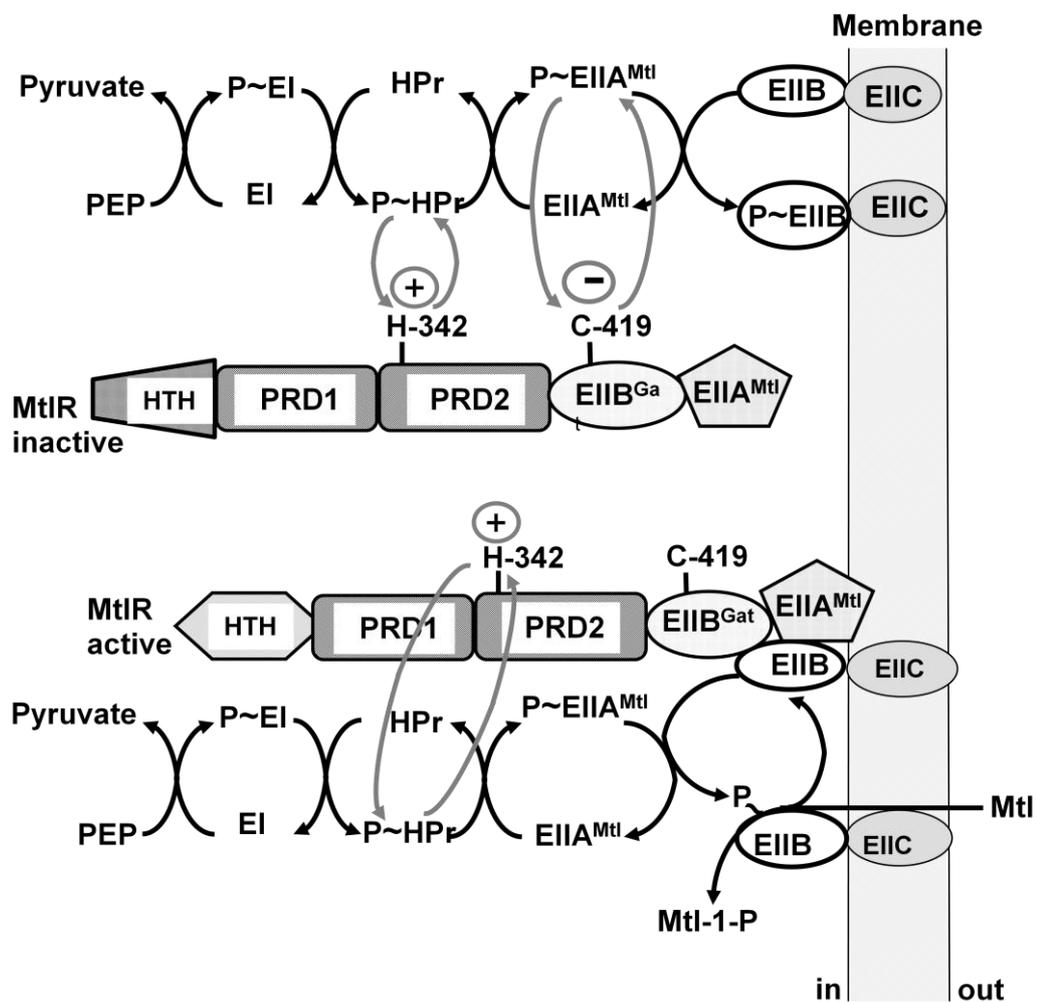


Fig. 7. Proposed model of MtlR activation by membrane sequestration mediated via the unphosphorylated EIIB^{Mtl} domain of MtlA. Shown are two specific growth conditions: In the absence of mannitol the PTS components are mainly present in phosphorylated form and MtlR is therefore phosphorylated by P~His-HPr at His-342 and by P~EIIA^{Mtl} at Cys-419. The latter phosphorylation renders MtlR inactive. In addition, the phosphorylated EIIB^{Mtl} domain of MtlA is probably not able to interact with MtlR and to stimulate its activity. In the presence of mannitol the mannitol-specific PTS components are present mainly in unphosphorylated form because the phosphoryl group transfer to the polyol is probably faster than the phosphoryl group transfer from P~His-HPr to EIIA^{Mtl}. P~His-HPr is therefore present in sufficient amounts to keep MtlR phosphorylated at His-342, which is essential for MtlR activity. In addition, the unphosphorylated EIIB^{Mtl} domain of MtlA interacts with MtlR and brings it in contact with the cytoplasmic membrane. In total, three conditions need to be fulfilled in order to render MtlR active. MtlR has to be phosphorylated by P~His-HPr at His-342, its Cys-419 must be dephosphorylated and it has to be sequestered to the membrane via unphosphorylated EIIB^{Mtl}.

IV. Résultats supplémentaires

A. L'interaction entre EIIB^{Mtl} et MtlR selon différentes formes de phosphorylation

Pour déterminer la relation entre l'état de phosphorylation de MtlR et de EIIB^{Mtl} et l'interaction de ces deux protéines, des expériences de double hybride ont été réalisées.

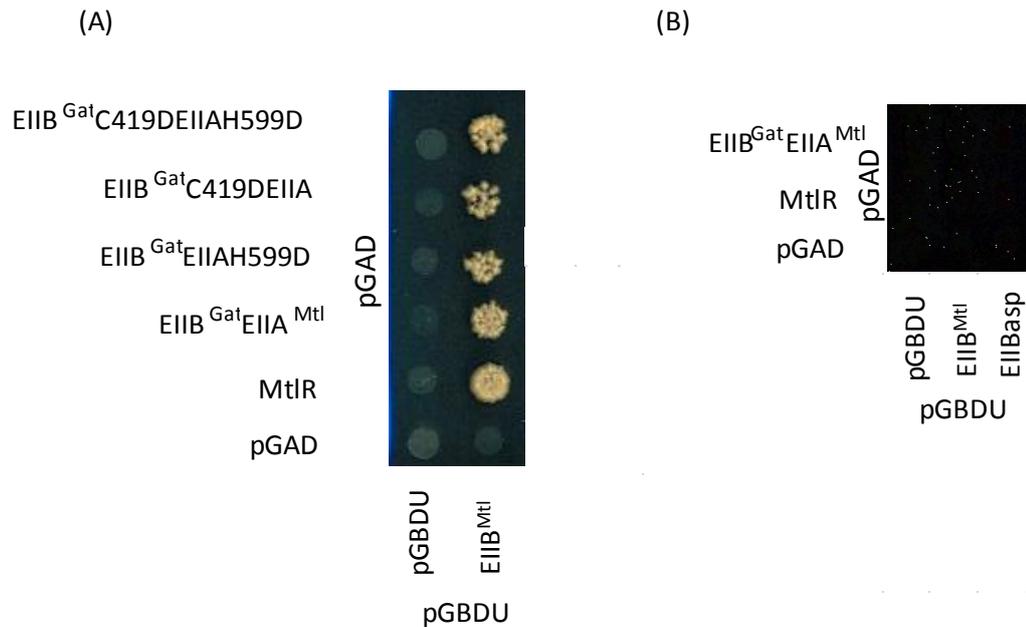


Figure 14: Croisement par double hybride

(A) : entre la protéine EIIB^{Mtl} et MtlR et les domaines EIIB^{Gat}EIIA sauvage et les mutants où la cystéine ou l'histidine sont remplacées par l'aspartate. (B) : entre EIIB^{Mtl}, EIIB^{Asp} et MtlR et les domaines EIIB^{Gat}EIIA.

EIIB^{Mtl} interagit avec MtlR et les domaines EIIB^{Gat}EIIA indifféremment de leur état de phosphorylation. Malgré l'inactivité *in vivo* de MtlR (Cys419Asp), une interaction des domaines EIIB^{Gat}C419DEIIA^{Mtl} de MtlR avec EIIB^{Mtl} est observée.

La protéine EIIB^{Mtl}Asp qui mime la phosphorylation ne montre aucune interaction ni avec MtlR entier ni avec les domaines EIIB^{Gat}EIIA ce qui appuie notre suggestion que c'est la forme déphosphorylée qui interagit avec MtlR.

B. Localisation de l'interaction EIIB^{Mtl}-MtlR

Pour localiser l'interaction EIIB^{Mtl}-MtlR, la fusion de MtlR à la GFP a été réalisée. La fusion *gfp-mtlR* est clonée dans le plasmide pDG1664 sous le contrôle du promoteur *xyl*.

Le promoteur *xyl* est amplifié avec l'amorce XylAproBam (voir tableau 12)/ R proXylE (GTTCTCTGGCAGTCATATAACATTCCCAGCATCACACGC). Le plasmide pBaSysBioII (Botella *et al.*, 2010) est utilisé pour amplifier la GFP.

La fusion *gfp-mtlR* est initialement construite dans le plasmide pMAD Δ HindIII avec les amorces :

D site BstB1 : ACAATCCATCTTCGAAGCGCCAATCG

R MtlR Linker : tgagccgcccgcctgagccgcccgcctcAGTATGTTTTTTCTTTCATCC

D linker GFP : gggcgggcgggctcaggcgggcgggctcaATGCGTAAAGGAGAAGAAC

R-GFP KpnI : CGGGGTTACCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC.

Le plasmide résultant pMAD Δ HindIIIGFP-MtlR a servi comme matrice pour amplifier *gfp-mtlR* avec les amorces :

D-proXylE-MtlR (GCGTGTGATGCGGGAATGTATATGACTGCCAGAGAAC)

Cter-GFP-EcoRI (CGGGAAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC)

Les souches PJ001 et Δ *mtlAFD* sont transformées avec le plasmide pDG1664PxylGFP-MtlR qui intègre leur chromosome dans le locus *thrC*.

Les photos montrées dans la Figure 15 ont été prises avec le microscope à fluorescence Olympus BX51. Nos images de la microscopie fluorescente montre qu'en absence de mannitol, MtlR est présent en quantité très faible. En présence de xylose l'inducteur de la fusion *gfp-mtlR*, la protéine est principalement localisée dans un des deux pôles de chaque cellule de la souche sauvage PJ001 ou du mutant Δ *mtlAFD*. En ajoutant le mannitol dans le milieu la protéine GFP-MtlR est libérée des pôles et s'est rassemblée en points distincts le long de toute la cellule qui semblent former une hélice dans la souche PJ001.

En fait, en présence de l'inducteur, MtlR est déphosphorylé par EIIA^{Mtl} qui est cytoplasmique mais il a aussi besoin de l'interaction avec EIIB^{Mtl} au niveau de la membrane.

Cependant la localisation polaire de la protéine GFP-MtlR est maintenue dans les cellules où l'opéron mannitol est délété. Cette localisation polaire est aussi observée dans un mutant Δ 3'-*mtlA*. Dans ces deux mutants MtlR est inactive Ce qui montre que la présence de MtlR au niveau des pôles des cellules est liée à l'état d'inactivation de MtlR et comme EIIB^{Mtl} est

nécessaire à l'activation de MtlR on peut dire que l'EIIB^{Mtl} joue un rôle dans le contrôle de la localisation de MtlR.

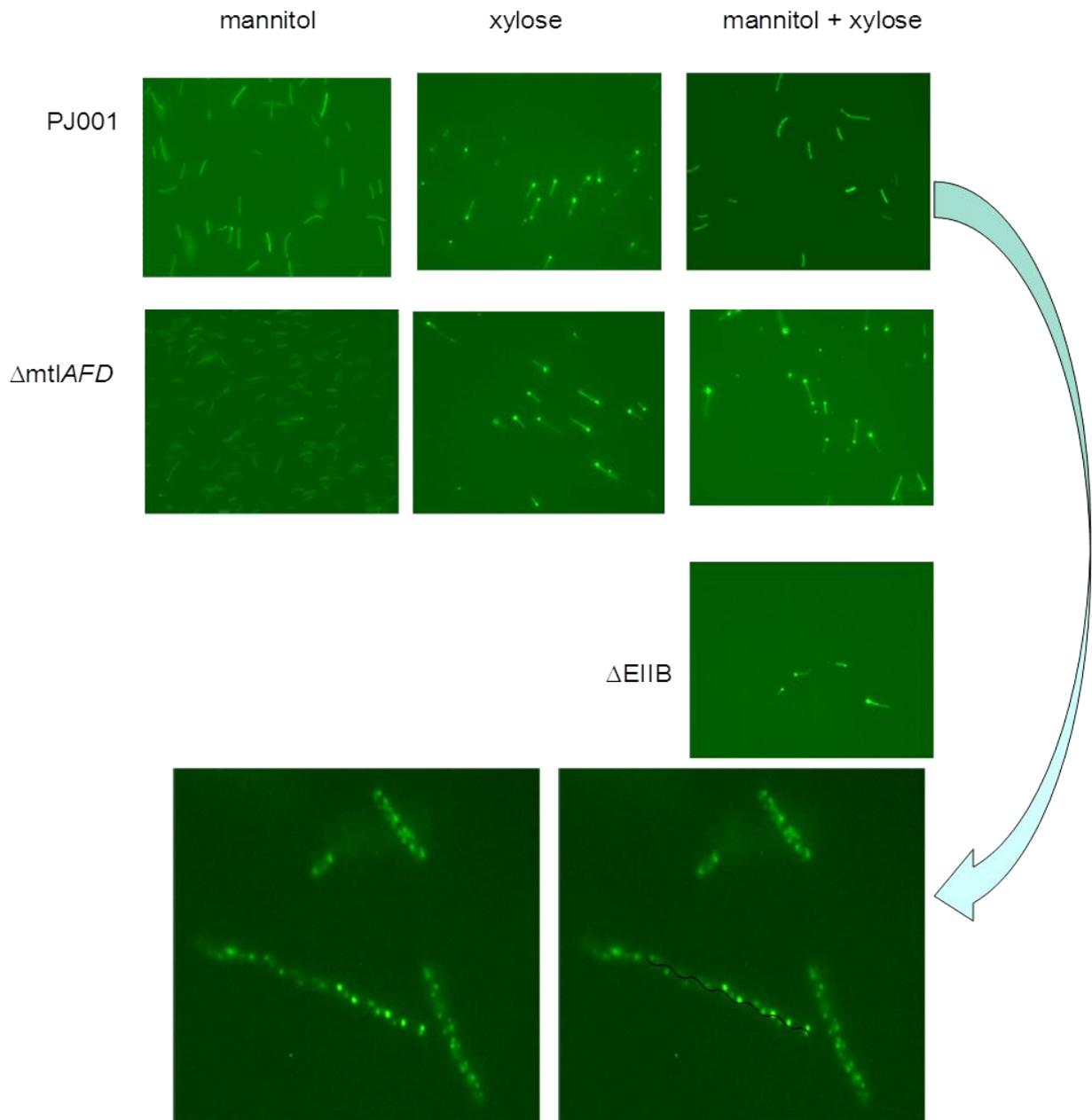


Figure 15 : localisation de la protéine fusionnée GFP-MtlR dans la souche PJ001 et le mutant $\Delta mtlAFD$

Cellules en fin de phase exponentielle en LB, LB + mannitol ou/et xylose 1%. 10 μ l de la culture + 10 μ l d'agarose 2% low melting déposés entre lame et lamelle.

Discussion générale

Chez les firmicutes, comme *B. subtilis*, la majorité des opérons PTS sont sujets à un contrôle positif soit par les antiterminateurs ou les activateurs de transcription. Ces protéines contiennent des domaines PRDs, et l'activité des antitrminateurs est régulée négativement ou positivement par une phosphorylation spécifique PTS dépendante sur l'un ou sur l'autre PRD (Deutscher *et al.*, 2006; Stülke *et al.*, 1998). En plus des PRDs et au contraire des antiterminateurs, les activateurs transcriptionnels contiennent un domaine EIIB^{Gat} et un domaine EIIA-like. Par conséquent, la régulation de l'activité des activateurs de transcription est plus complexe.

L'expression de l'opéron mannitol, *mtlAFD* chez *B. subtilis*, est régulée par l'activateur de transcription MtlR. MtlR régule l'opéron selon son état de phosphorylation dépendant de la disponibilité de l'inducteur, le mannitol, dans le milieu.

La phosphorylation de MtlR par les protéines du PTS mannitol ainsi que l'effet de ces phosphorylations sur l'activité du régulateur ont été bien étudié chez *G. stearothermophilus* (Henstra *et al.*, 1996) et *B. subtilis* (Joyet *et al.*, 2010).

Dans ce travail nous rapportons que EIIB^{Mtl} en plus du transfert du groupement phosphate pour permettre l'utilisation du mannitol par la bactérie il est aussi impliqué dans la régulation de l'activité de MtlR.

Nous avons observé que dans un mutant $\Delta mtlAFD$ où tout l'opéron mannitol est délété et dans un mutant $\Delta 3'mtIA \Delta mtlF$ où seulement EIIB^{Mtl} et le domaine EIIB^{Mtl} de MtlA sont délétés, l'activité constitutive de MtlR dans un mutant $\Delta mtlF$ déjà observé (Joyet *et al.*, 2010) est abolie .

Pour démontrer l'implication de l'EIIB^{Mtl} dans l'activation de MtlR nous avons mis en évidence une interaction directe entre les deux protéines EIIB^{Mtl} et MtlR par le test double hybride dans la levure. Comme montré dans les résultats cette interaction est spécifiquement établie avec les deux domaines C-terminal de MtlR, EIIB^{Gat}EIIB^{Mtl}-like.

EIIB^{Mtl} soluble et l'activité de MtlR

Dans la plupart des transporteurs PTS le domaine EIIB est fusionné au domaine transmembranaire EIIC. Chez les PTS de la classe lactose/cellobiose et mannose les EIIB existent souvent comme protéine distincte cytoplasmique. Plusieurs études ont démontré que la séparation de ces deux domaines dans les protéines EIIB-EIIC fusionnées rend EIIB également active et capable de transférer le groupement phosphate (Pogge von Strandmann *et al.*, 1995; Robillard et Broos, 1999). Comme déjà mentionné, chez *B. subtilis* EIIB^{Mtl} est un domaine fusionné à la perméase EIIC^{Mtl} située dans la membrane. Une complémentation du mutant $\Delta mtlAFD$ avec EIICB^{Mtl} entière reconstitue l'activité de MtlR. Cependant l'interaction entre EIIB^{Mtl} surproduite dans le cytoplasme et MtlR ne semble pas avoir un effet positif sur l'activité de cette dernière. Cela est démontré par la complémentation des mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtIA \Delta mtlF$ avec EIIB^{Mtl} où l'activité de MtlR n'est pas restaurée mais aussi par l'inhibition de l'activité de MtlR dans des mutants montrant une expression constitutive de l'opéron *mtlAFD* (*mtlRHis342D* et $\Delta mtlF mtlRCys419A$) suite à l'ajout de EIIB^{Mtl}. L'interaction de MtlR avec l'EIIB^{Mtl} surproduite dans le cytoplasme aura donc un effet négatif sur l'activité du régulateur. Une explication possible pour cet effet pourrait être que l'interaction de MtlR avec la forme soluble ne stimule pas son activité et que la surproduction de EIIB^{Mtl} soluble favorise l'interaction de MtlR avec EIIB^{Mtl} cytoplasmique et empêchera ainsi l'interaction de MtlR avec le domaine EIIB^{Mtl} lié au domaine EIIC^{Mtl}, ce qui conduit à une inhibition de l'activité de MtlR. Ces résultats qui démontrent que seulement la forme EIIB^{Mtl} fusionné à la perméase EIIC^{Mtl} est capable d'activer MtlR lient surtout l'activité de MtlR à la localisation de EIIB^{Mtl} qui doit vraisemblablement être fusionné à une protéine membranaire pour pouvoir activer MtlR.

La séquestration à la membrane

Dans la cellule EIIB^{Mtl} est fusionnée à la protéine EIIC^{Mtl} mais nous avons démontré que ce n'est pas EIIC^{Mtl} qui est essentielle à l'interaction entre EIIB^{Mtl} et MtlR et le voisinage de la membrane suffira pour activer MtlR. Cela est bien démontré dans les complémentations des mutants $\Delta mtlAFD$ et $\Delta 3'mtIA \Delta mtlF$ avec la fusion YwqC-EIIB^{Mtl}. L'activité de MtlR dans les souches complémentées est indépendante de la présence ou l'absence de EIIC^{Mtl}.

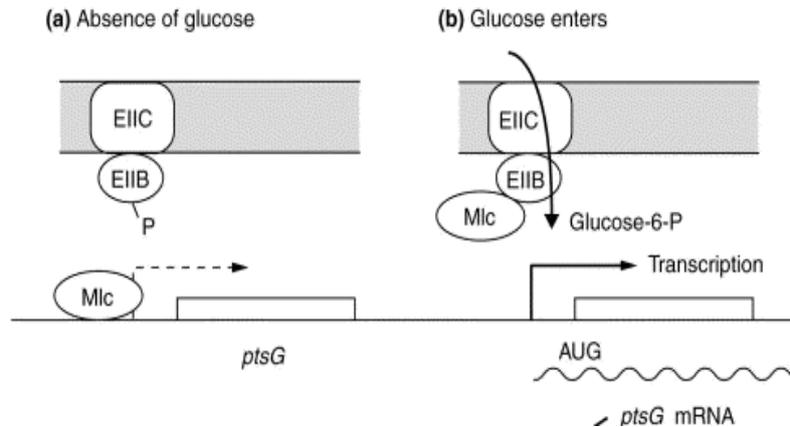
L'inhibition ou l'activation via la séquestration à la membrane a été démontré pour différents régulateurs de *E. coli*. C'est le cas pour le répresseur Mlc du PTS glucose, mannose,

d'EI, d'HPr et indirectement de l'activateur du régulon *mal* (Tanaka et al., 2000), l'antitermineur BglG et comme récemment démontré pour le régulateur MalT (Richet *et al.*, 2012). Les mécanismes de la régulation de ces protéines sont similaires à celui de MtlR de *B. subtilis*, mais il y a des différences spécifiques. En absence de glucose EIICB^{Glc} est présent sous la forme phosphorylée et elle n'interagit pas avec Mlc. Dans cette situation, le gène *ptsG* est réprimé par la liaison de Mlc en amont de son promoteur. L'internalisation du glucose déphosphorylé EIICB^{Glc} et qui, sous cette forme, se lie à Mlc (Figure 16-A). Cela entraîne la production de EIICB^{Glc} et d'autres protéines impliquées dans le transport du glucose (comme le PTS mannose, EI et HPr) (Tanaka *et al.*, 2000). Contrairement à MtlR de *B. subtilis* Mlc est inhibé par l'interaction avec l'EIICB^{Glc} et sa séquestration à la membrane.

BglF (EII^{Bgl}) de *E. coli* intervient dans le transport des β -glucosides et contrôle aussi l'antitermineur BglG par phosphorylation réversible selon la disponibilité des β glucosides dans le milieu. En absence de β -glucosides, le domaine EIIB de BglF phosphoryle BglG et bloque sa dimérisation et son activité ce qui engendre une terminaison prématurée de la transcription de l'opéron *bgl*. En présence d'inducteur (β -glucosides) BglF déphosphoryle BglG qui se dimérise et se lie à la région de terminaison de la transcription (séquence RAT) et permet ainsi la synthèse de l'ARN (Amster-Choder, 2005) (Figure 16-B).

En plus, le domaine EIIB^{Bgl} du BglF interagit avec BglG en absence de l'inducteur. Comme montré avec la fusion de BglG à la « Green Fluorescent Protein » (GFP), dans cette condition BglG est séquestrée à la membrane. En revanche, en présence de l'inducteur, BglG est relâchée dans le cytoplasme. L'interaction entre BglF et l'inducteur change probablement la conformation de BglF. Lopian et ses collaborateurs proposent que ce changement est aussi la raison de la séparation entre BglF et BglG (Lopian *et al.*, 2003). La phosphorylation du domaine EIIB^{Bgl} en absence du substrat de BglF ne semble pas jouer un rôle dans l'interaction entre BglF et BglG, parce que le remplacement du Cys24 dans BglF par une sérine n'a pas changé cette interaction. Vu qu'il a été montré que le domaine EIIB^{Mtl} de *E. coli* portant un remplacement de la cystéine-384, site de phosphorylation, par une sérine était toujours phosphorylée par l'EIIA^{Mtl} et que cette phosphorylation était plus stable que la phosphorylation sur la cystéine, (Opacic *et al.*, 2010), la conclusion que la phosphorylation du BglF ne joue pas un rôle reste douteuse.

(A)



(B)

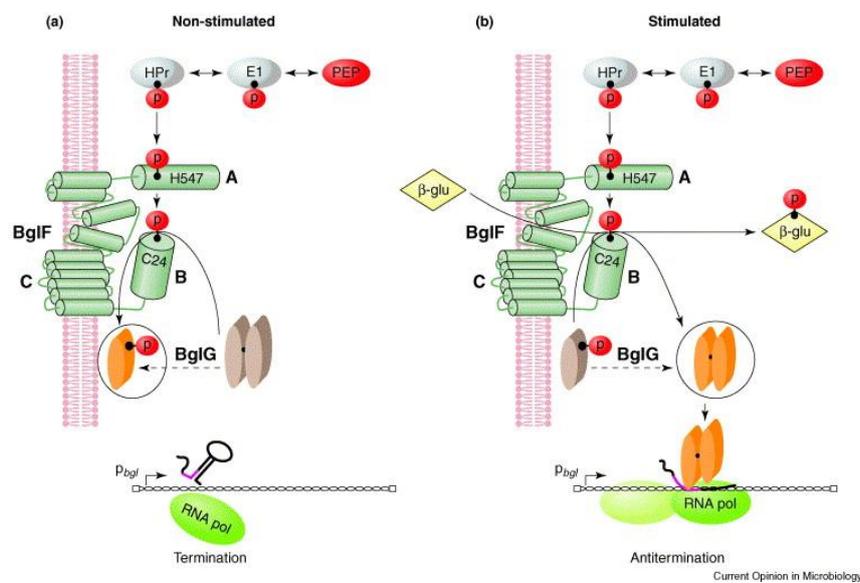


Figure 16 : Modèles schématisant la séquestration de (A) MIC et (B) BglG à la membrane et son effet sur l'activité des opérons *ptsG* et *bgl* respectivement (Plumbridge, 2002; Amster-Choder, 2005)

Récemment, il a été démontré que MalT, l'activateur transcriptionnel du régulon *mal* chez *E. coli* est séquestré à la membrane par le ABC transporteur MalFGK₂ en absence du maltose ce qui empêche son activation par le maltotriose intracellulaire (Richet *et al.*, 2012). En revanche, en présence du maltotriose MalT semble ne pas interagir avec MalFGK₂.

En dehors de la séquestration à la membrane il semble qu'il existe aussi un mécanisme de régulation par simple interaction d'un régulateur à PRD avec son EIIB. C'est le cas de ManR de *L. monocytogenes*, qui régule l'expression de l'opéron *manLMN* qui est contrôlé par les composants du PTS^{Mpo}. Similaire aux résultats obtenus pour MtlR, la délétion de l'EIIA^{Mpo} permet une activité constitutive et très élevée de ManR (Aké *et al.*, 2011). En revanche, si l'EIIB^{Mpo} est également délétée, ManR devient inactive. ManR a donc besoin de l'EIIB^{Mpo}, qui n'est pas fusionnée à l'EIIC^{Mpo} mais qui est une protéine cytoplasmique soluble. Contrairement aux résultats obtenus pour MtlR de *B. subtilis*, la complémentation du double mutant $\Delta mpoA \Delta mpoB$ avec le gène *mpoB* restaure l'activité de ManR chez *L.monocytogenes*.

L'effet de la phosphorylation

L'état de phosphorylation de MtlR sur les domaines EIIB^{Gat}-EIIA^{Mtl}-like ne semble pas être déterminant dans l'établissement de l'interaction entre EIIB^{Mtl} et MtlR. De même, les trois sites de phosphorylation sur BglG par BglF ne sont pas essentiels à l'interaction BglF-BglG (Lopian *et al.*, 2003).

L'interaction entre les deux protéines EIIB^{Mtl} et MtlR dans la levure, qui ne possède pas des protéines du PTS, nous a laissé prédire que c'est la forme non phosphorylée de EIIB^{Mtl} qui interagisse avec MtlR. Cette hypothèse est également soutenue par la forte activité constitutive de MtlR observée dans le mutant $\Delta mtlF$. Dù à l'absence de EIIA^{Mtl}, EIIB^{Mtl} n'est pas phosphorylée dans ce mutant. Ce résultat montre que EIIB^{Mtl} en forme non-phosphorylée interagit avec MtlR et stimule son activité. Mais nous ne savons pas si EIIB^{Mtl} en forme phosphorylée a perdu la capacité d'interagir avec MtlR. C'est probable parce que l'activité de MtlR dans les mutants $\Delta mtlAFD$ complémenté avec YwqC-EIIB^{Mtl} Cys-Ala et avec EIICB^{Mtl} Cys-Ala et $\Delta 3'mtlA \Delta mtlF$ complémenté avec YwqC-EIIB^{Mtl} Cys-Ala est comparable à l'activité observée dans les complémentations avec la forme sauvage de EIIB^{Mtl}; cependant l'activité de MtlR dans les souches complémentées avec YwqC-EIIB^{Mtl} Cys-Asp et EIICB^{Mtl} Cys-Asp est 3 fois moins forte. Le remplacement d'un résidu Cys phosphorylable par un Asp est probablement phosphomimétique.

D'une manière comparable, Mlc et PstG ne se rassemble pas en absence de l'inducteur, au contraire Mlc ne se lie pas a PtsG phosphorylé mais seulement après la déphosphorylation de ce dernier par le glucose.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale

Les résultats obtenus dans ce travail ainsi que ceux déjà observés dans notre équipe (Joyet *et al.*, 2010) nous ont permis de proposer un modèle de régulation de l'activité du régulateur MtlR présenté dans la Figure 17

Il a été démontré donc que trois conditions, au moins, sont nécessaires à l'activation de MtlR :

- ✓ sa phosphorylation sur l'histidine 342 de son PRDII, (Joyet *et al.*, 2010)
- ✓ sa déphosphorylation sur son Cystéine 419 du domaine EIIB^{Gat}, en présence de l'inducteur, (Joyet *et al.*, 2010)
- ✓ et son interaction physique avec EIIB^{Mtl}.

La cellule avec ces trois conditions a mis toutes les chances pour mieux gérer ces dépenses énergétiques. En absence de mannitol, la cellule n'a pas besoin d'exprimer l'opéron mannitol. Les quelques molécules de MtlR présentes dans le cytoplasme sont toujours phosphorylées sur le site de son régulation négative Cys419 par EIIB^{Mtl} et n'entrent pas en contact avec EIIB^{Mtl} encore en forme phosphorylée. En présence de l'inducteur, la chaîne du transfert du phosphate se continue jusqu'à la phosphorylation du substrat et donc l'équilibre se déplace progressivement vers plus de molécules MtlR déphosphorylées sur le Cys419 par la P~EIIB^{Mtl} et plus de EIIB^{Mtl} déphosphorylée ce qui favorisera l'interaction entre les deux protéines, EIIB^{Mtl} et MtlR, et permettra l'expression du régulateur et la transcription de l'opéron mannitol. L'induction de l'opéron *mtl* nécessitera aussi la phosphorylation du PRDII de MtlR par la P~His-HPr. Cette phosphorylation diminue en présence de sucre rapidement métabolisable et sert de mécanisme de répression catabolique CcpA indépendante.

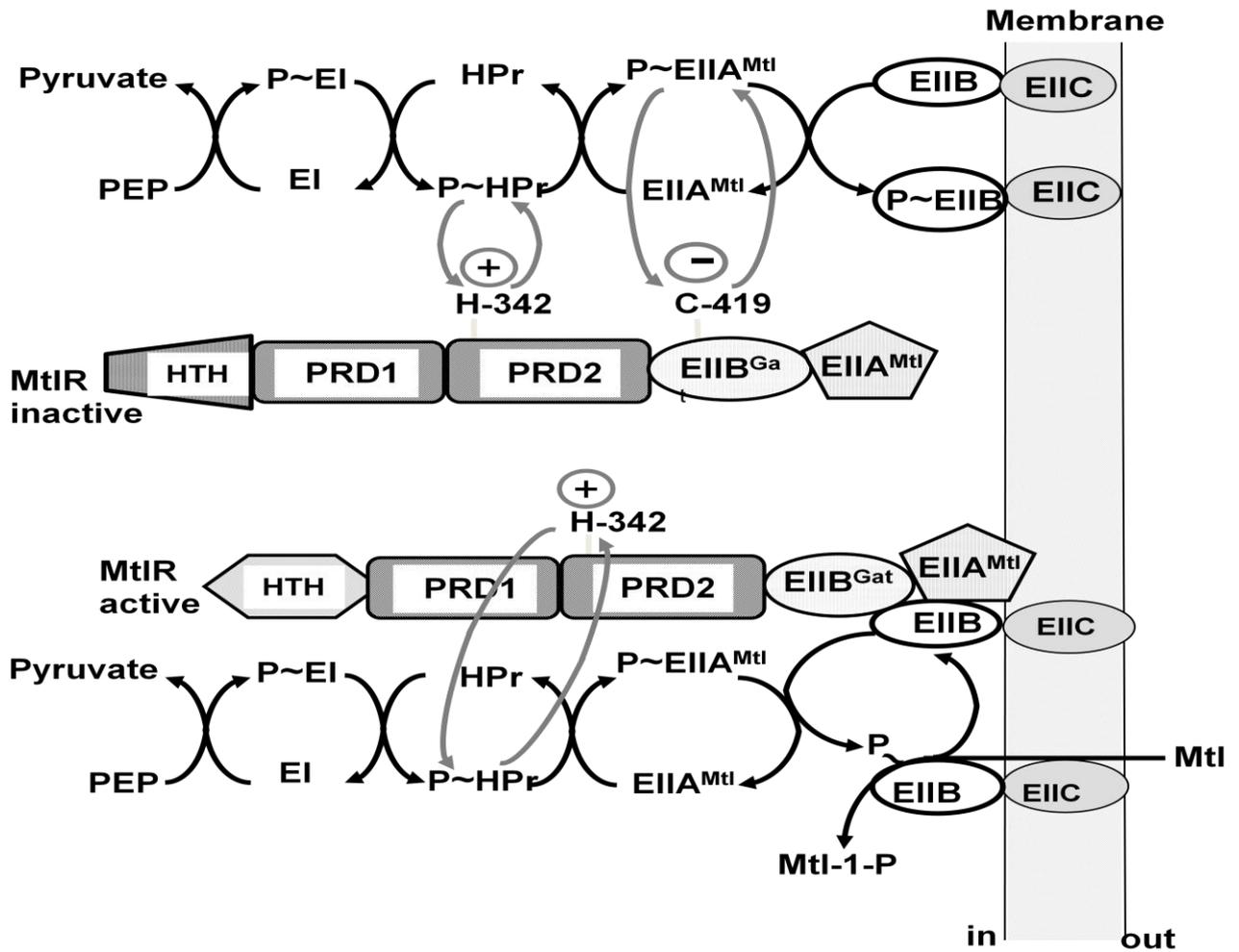


Figure 17 : Modèle proposé pour la régulation de l'expression de l'opéron *mtl* via l'activation de MtlR.

Perspectives

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse nous a permis de mettre en évidence le rôle de EIIB^{Mtl} dans l'activation de MtlR non pas via la phosphorylation mais via une interaction physique. Cependant cela n'est que le début et de nombreux autres travaux pourraient être envisagés pour mieux comprendre les différents aspects de cette interaction.

Pour cela il sera intéressant de :

- ✓ Confirmer cette interaction par des approches biochimiques : les protéines EIIB^{Mtl}, EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like sont purifiées et des tests de chromatographie d'affinité ont été réalisés par le système Affi-Gel 15. Cependant cette manipulation demande encore des mises au point surtout avec la protéine EIIB^{Mtl} phosphorylée.

Si le remplacement de la cystéine du site actif du domaine EIIB^{Mtl} de *E.coli* par une serine, laisse la protéine toujours phosphorylable et la liaison du groupement phosphate était très stable, on pourrait tenter de synthétiser de la même façon P-Ser-EIIB^{Mtl} de *B. subtilis* et faire des tests d'interaction *in vitro*.

- ✓ Etudier l'interaction de EIIB^{Mtl} avec les différents mutants de MtlR comme le mutant constitutif *mtlRH342D* et Δ *mtlF mtlRC419A*. Cette étude est envisageable aussi avec les formes mutées de EIIB^{Mtl} où la cystéine est remplacée par une alanine, une aspartate ou une serine.
- ✓ Obtenir la structure cristallographique des EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}, EIIB^{Mtl} et du complexe EIIB^{Gat}EIIA- EIIB^{Mtl} sauvage et de MtlR sauvage et mutée His/Asp dans le domaine PRDII, qui représente la forme active de MtlR, et dans le domaine EIIB^{Gat}. Ces études pourraient être fait en présence ou en absence des fragments d'ADN contenant le site de fixation de MtlR.
- ✓ Des études sont déjà entreprises pour comparer la régulation de l'opéron *mtl* via MtlR chez d'autres bactéries comme *Lactobacillus casei* chez laquelle la cystéine de EIIB^{Gat} de MtlR de *B. subtilis* est remplacée par une tyrosine.

Les résultats de la fluorescence nous ont permis de voir une différence de localisation de MtlR en présence et en absence de mannitol, l'inducteur de l'opéron mannitol. Nous avons également vu des différences entre souche sauvage et des mutants portant une mutation totale de l'opéron ou seulement du domaine EIIB^{Mtl}. Pour mieux comprendre ces différences de localisation il sera nécessaire de :

- ✓ Explorer le rôle de deux phosphorylations de MtlR dans sa localisation cellulaire.
- ✓ Montrer une potentielle co-localisation de MtlR et MtlA par fluorescence en fusionnant les deux protéines à deux protéines fluorescente différentes.

Annexe

Annexe 1

J'ai commencé au cours de ma première année de thèse à travailler sur le mécanisme de l'exclusion de l'inducteur chez *B.subtilis*. C'est un travail que j'ai réalisé sous la co-direction scientifique de M^{me} Sandrine Poncet.

Je présente les principaux résultats cohérents obtenus.

L'exclusion d'inducteur chez *B.subtilis* :

Contrairement à ce qui se passe chez les bactéries à Gram-, chez les bactéries à Gram positif, ce n'est pas l'EIIA^{Glc} qui inhibe les perméases non-PTS, mais la P-Ser-HPr. En effet, une souche sauvage de *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis* transporte le maltose ou le ribose par un système ABC transporteur. Le transport de ces deux sucres s'arrête instantanément quand on ajoute du glucose au milieu. Dans un mutant *hprK* ou *ptsHI* (synthétisant une HPr non phosphorylable par l'HprK/P), ce transport n'est pas affecté en présence de glucose. En revanche, l'allèle *hprKV267F*, qui permet l'accumulation de la P-Ser46-HPr dans la cellule quelque soit la composition du milieu en sucre, inhibe le transport du maltose même en absence de glucose (Monedero *et al.*, 2001b). Ces résultats confirment que la P-Ser46-HPr est impliquée dans l'exclusion d'inducteur chez *L. casei*. Cependant, malgré de nombreuses tentatives, le mécanisme moléculaire de l'exclusion d'inducteur médié par la P-Ser46-HPr n'a pas été résolu.

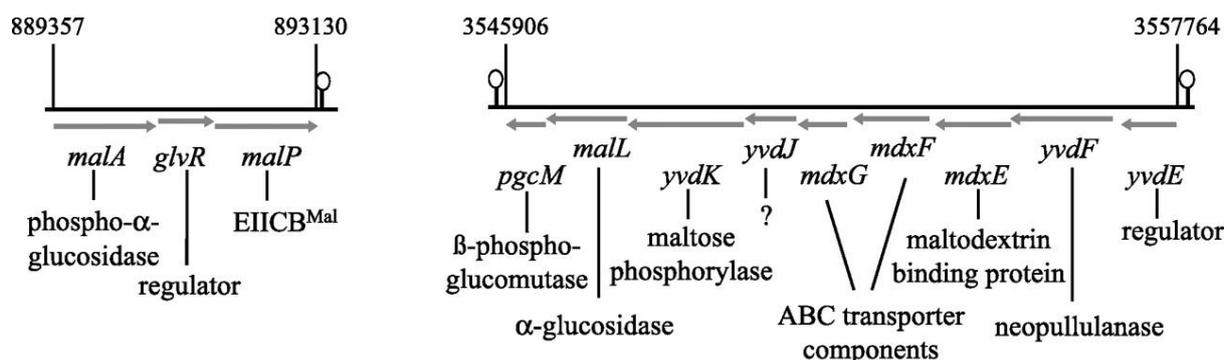


Figure 18 : L'opéron *mal* et la région *yvdE-pgcM* chez *B.subtilis* (Schönert *et al.*, 2006)

Le transport des maltodextrines chez *B.subtilis* reste encore mal compris. C'est un système ABC transporteur qui est soupçonné être impliqué dans le transport du maltose et/ ou des maltodextrines (Figure 18). L'opéron *mal* est composé de neuf gènes. Le dernier gène

pgcM code pour une β - phosphoglucomutase/glucose-1-phosphate phosphodismutase qui phosphoryle les molécules de glucose supposées issues de la dégradation du maltose et des maltodextrines (Mesak et Dahl, 2000). En se basant sur l'homologie des séquences, les autres gènes codent pour un régulateur transcriptionnel (*yvdE*), protéine pour liaison au substrat (*mdxG* : *yvdG*) et deux perméase liées à la membrane (*mdxF* : *yvdH* et *mdxG* : *yvdI*) d'un système ABC transporteur, une amylase cytoplasmique (*yvdF*), et une maltose phosphorylase (*yvdK*). Pas de fonctions prédites pour YvdJ. Au cours d'un crible triple hybride chez la levure, nous avons mis en évidence, en collaboration avec Philippe Noirot (INRA, Jouy en Josas), une interaction spécifique entre la P-Ser46-HPr et la protéine YvdI de *B. subtilis*. La région d'interaction avec la P-Ser46-HPr est localisée à l'extrémité C-terminale cytoplasmique d'YvdI, et une recherche d'homologie a permis de montrer que cette région peptidique était très conservée dans plusieurs transporteurs à sucre non PTS chez *B. subtilis*. Notre hypothèse est donc que l'interaction YvdI/ P-Ser46-HPr médierait l'exclusion d'inducteur du sucre transporté par YvdI.

Afin de mettre en évidence le rôle de YvdI et de la P-Ser-HPr dans l'exclusion d'inducteur du maltose chez *B. subtilis*, des approches physiologiques et biochimiques ont été utilisées.

Approche physiologique

Afin de mettre en évidence le rôle de la protéine HPr sur l'exclusion d'inducteur du maltotriose, la croissance en milieu minimum MM + maltotriose 0.2% de différentes souches de *B. subtilis* a été étudiée. Le tableau suivant détaille le génotype des différentes souches utilisées pour la construction des mutants étudiés.

TG100	<i>trpC2 amyE::(ynaJ'-lacZ cat) hprK::hprK* L. C.-erm-ppspac</i>
TG101	<i>trpC2 amyE::(ynaJ'-lacZ cat) hprK::hprK L. C. V267F-erm-ppspac</i>
TG202	<i>trpC2 amyE::(ynaJ'-lacZ cat) hprK::hprK* L. C.-erm-ppspac) ccpA::spec</i>
TG203	<i>trpC2 amyE::(ynaJ'-lacZ cat) hprK::hprK L. C. V267F-erm-ppspac) ccpA::spec</i>
GM1038	<i>sacA321 Δ(sacR-B)23 ccpA::Tn917::phleo (Δerm lacZ)</i>
GM1222	<i>trpC2 pheA1ΔlacA amyE::gntRK'-lacZ)ptsH1 cat</i>
GR14	<i>trpC2pheA1ptsHΔDHcat</i>

A- Effet de la P-Ser-HPr :

Souche	Croissance sur Milieu M+ maltotriose 0.2%
BSB	+
BSB hprK L.casei	+
BSB hprKV267F	-
BSB hprKV267F ptsH1	+

B. subtilis est capable d'utiliser le maltotriose comme seule source de carbone (Croissance de la souche BSB). En revanche, la souche BSB hprKV267F, exprimant une HprK de *L. casei* permettant la phosphorylation d' HPr sur sa sérine 46 quelles que soient les conditions de croissance, ne pousse pas en MM+maltotriose, ce qui suggère que l'accumulation de P-Ser46-HPr empêche l'utilisation du maltotriose. La souche BSB exprimant l'allèle sauvage de l'HprK de *L. casei* pousse sur MM+maltotriose, ce qui montre que ce phénotype est bien dû à l'activité « kinase constitutive » de l'hprK-V267F, et donc bien à la présence dans la cellule d'HPr-S46-P. Ce résultat est confirmé par la souche BSB hprKV267F ptsH1 : le remplacement du résidu sérine 46 par une alanine non phosphorylable lève l'inhibition de croissance due à la présence de l'HprKV267F.

B- Cet arrêt de croissance est-il dû à une répression CcpA-dépendante ?

Souche	Croissance sur MM+ maltotriose 0.2%
BSB ccpA	+
BSB hprK <i>L.casei</i> ccpA	+
BSB hprKV267F ccpA	-

La P-S46-HPr associée au régulateur transcriptionnel CcpA médie la RC et contrôle environ 10% du génome de *B. subtilis*. L'inhibition de l'utilisation du maltotriose par P-S46-HPr est-elle CcpA dépendante ? Cette inhibition correspond-elle à la répression transcriptionnelle de l'opéron impliqué dans le transport et l'utilisation du maltotriose ? L'inactivation du gène *ccpA* n'a aucun effet sur la croissance de *B. subtilis* en MM+maltotriose dans un contexte hprK WT (souche BSB ccpA) ou dans la souche exprimant l'allèle hprK WT de *L. casei* (souche BSB hprK *L.casei* ccpA). Par ailleurs, l'absence de CcpA ne restaure pas la croissance de la souche accumulant la P-S46-HPr (souche BSB hprKV267F ccpA).

Ces résultats montrent que l'effet négatif de la P-S46-HPr sur l'utilisation du maltotriose n'est pas dépendant de CcpA. Il ne s'agit donc pas d'une RC CcpA-dépendante.

Approches biochimiques

Deux fragments de tailles différentes correspondant à la séquence C- terminale du gène *yvdl* ont été clonés dans le plasmide pGEX-2T. Le plasmide pGEX-2T-Yvdl-A correspond aux 37 acides aminés C-terminaux de Yvdl, pGEX2T-yvdl-B aux 21 acides aminés C-terminaux. La protéine GST-Yvdl-B a été purifiée sous forme soluble dans les conditions natives. Par contre, la protéine GST-Yvdl-A n'est pas purifiable dans ces conditions, et l'analyse par gel SDS-PAGE des différentes étapes de la purification montre que cette

protéine s'accumule sous forme de corps d'inclusion insolubles chez *E. coli*. Nous avons donc tenté de mettre en évidence l'existence d'une interaction protéine/protéine entre GST-YvDI-B et la P-Ser-HPr. Les protéines GST-YvDI-B, HPr et P-Ser-HPr ont été utilisées dans des expériences de retard d'élution sur colonne d'affinité. Une mini colonne Glutathione-sépharose a été saturée avec 0.4 mg de protéine GST-YvDI-B, puis un mélange équimolaire d'HPr/P-Ser-HPr déposé sur la colonne. L'analyse des éluats sur gel natif 12.5% ne montre aucun retard d'élution de la forme phosphorylée par rapport à la forme non phosphorylée d'HPr. Aucune interaction entre la P-Ser-HPr et GST-YvDI-B n'a donc pu être montrée par cette approche. Le passage des mélanges HPr/GST-YvDI-B et P-Ser-HPr/GST-YvDI-B à travers la colonne Glutathione-sépharose n'a montré aucun retard d'élution de la P-Ser-HPr. Par ailleurs, aucune interaction n'a été mise en évidence en utilisant un pontage chimique avec du formaldéhyde à 6%.

Nous avons donc tenté une approche différente en testant si l'ajout de la protéine GST-YvDI-B à un mélange P-Ser-HPr/HprK/P pouvait inhiber, par interaction protéine/protéine avec le substrat, l'activité phosphorylase de l'HprK/P. Comme le montre la Figure 19, aucun effet n'a été observé.

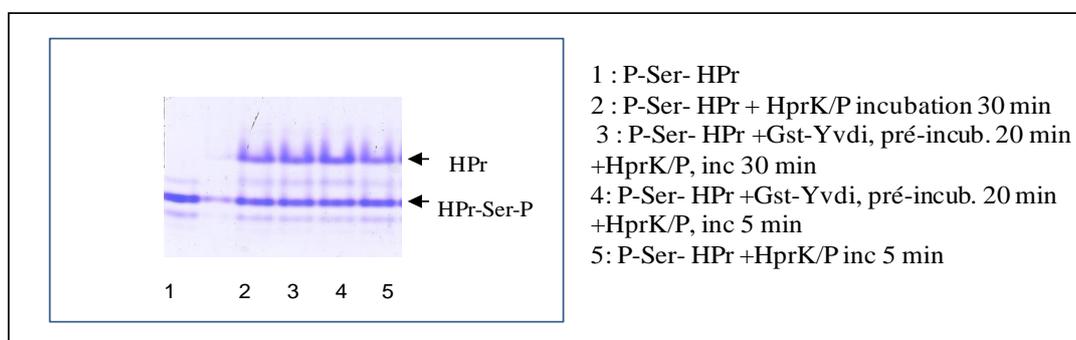


Figure 19 : Déphosphorylation de la P-Ser-HPr en présence de la GST-YvDI

Nous n'avons donc pas réussi à démontré l'existence d'une interaction entre les protéines GST-YvDI-B et P-Ser-HPr.

La protéine GST-YvDI-A, surexprimée chez *E. coli* s'accumule sous forme de corps d'inclusion, ce qui suggère qu'elle se replie sous une conformation incorrecte. S'il existe une interaction entre YvDI et la P-Ser-HPr, la surexpression simultanée des deux protéines chez *E. coli* pourrait permettre, par interaction protéine/protéine, le repliement de la GST-YvDI-A sous forme native, donc soluble, dans la cellule. Afin de tester cette hypothèse, j'ai construit

des opérons artificiels permettant la co-expression des protéines GST-YvdI-A avec : (His)₆-HPrS46D (qui mime la forme P-Ser-HPr), (His)₆-HPrS46A (forme non phosphorylable sur la sérine 46 de HPr) et (His)₆-HPrH15D (qui mime la forme P-His₁₅-HPr).

Après induction à l'IPTG, les fractions protéiques des différentes souches *E. coli* surexprimants ces combinaisons de protéines ont été soumises en parallèle à la purification sur colonnes de Ni-agarose et de glutathione-sépharose en conditions natives.

En présence de HPr non phosphorylée ou de HPrH15D, seules les protéines HPr et HPrH15D ont été purifiées sur Ni-agarose. 100% de la protéine GST-YvdI-A a été retrouvée dans la fraction insoluble, ce qui montre que dans ces conditions, GST-YvdI-A est accumulée sous forme de corps d'inclusion. En présence de (His)₆-HPrS46D, une faible fraction de GST-YvdI-A est retrouvée sous forme soluble (Figure 20, lignes 2 et 3). La protéine GST-YvdI est spécifiquement retenue sur la matrice GST-agarose et retient HPrS46D (ligne 2). Inversement, HPrS46D est spécifiquement retenue sur Ni-NTA et retient GST-YvdI-A (ligne 3). Ces résultats suggèrent qu'il existe bien une interaction entre les protéines YvdI et P-Ser-HPr.

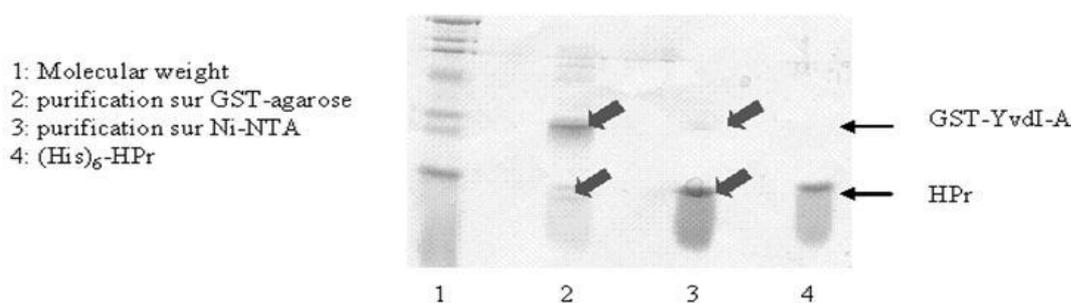


Figure 20: Co-purification des protéines GST-YvdI-A et HPrS46D

Construction des plasmides :

Le gène *yvdI* a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur pGEX-2T. Ce plasmide possède le gène *bla* conférant une résistance à l'ampicilline et le gène *gst* codant la glutathione transférase. Le gène inséré dans le site multiple de clonage est placé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur *tac* inductible à l'IPTG, en fusion traductionnelle avec le gène *gst*. Après induction par l'IPTG, ce plasmide permet la surproduction de protéines recombinantes portant une étiquette GST (26kDa) fusionnée à leur extrémité C-terminale, purifiables facilement par chromatographie d'affinité sur une colonne Glutathione-sépharose.

Les plasmides recombinants présentant le bon profil PCR sont vérifiés par séquençage.

Purification des protéines :

Les protéines HPr de *B. subtilis* et l'HPr kinase \square 123V267F de *Lactobacillus casei* portant une étiquette poly-histidine ont été purifiées à partir des souches NM522 (pAG2) et (pQE30- \square 123V267F)

La protéine GST-Yvdl a été purifiée sur colonne d'affinité Glutathione-sépharose en suivant les recommandations du fournisseur (GE-Healthcare). Le surnageant est déposé sur une colonne d'une résine contenant du glutathione et prééquilibrée avec 20 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Le surnageant est bien mélangé avec la résine pour favoriser la fixation maximale de la protéine. Cette dernière est éluée avec une solution du Tris-HCl 50 mM pH 8, glutathion 10 mM, puis dialysée.

Phosphorylation des protéines :

L'HPr est phosphorylée sur son résidu Sérine 46 dans le milieu réactionnel suivant : 0.5 mg d'HPr, 0.01 mg d'HPrK/P en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, FBP 1 mM (fructose-1,6-bisphosphate) et ATP 5 mM. Après 20 min d'incubation à 37°C, on vérifie que la phosphorylation est complète sur gel natif 12.5%. L'HprK/P est alors inactivée par chauffage à 70°C 10 min, puis le mélange réactionnel est dessalé sur tamis moléculaire par passage sur une colonne pD10 (GE-Healthcare). Après lyophilisation, la protéine P-Ser-HPr est reprise en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.4 et sa concentration déterminée par dosage de Bradford.

Annexe 2

En plus de mon travail principal de thèse j'avais l'occasion de participer à d'autres travaux qui ont été en cours au laboratoire.

Ici je présente un article dont je suis co-auteur dans lequel le PTS incomplet de *Brucella melitensis* est caractérisé.

Références

Bibliographiques

- Aké FMD, Joyet P, Deutscher J, Milohanic E (2011) Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **81**: 274-293
- Allen GS, Steinhauer K, Hillen W, Stülke J, Brennan RG (2003) Crystal structure of HPr kinase/phosphatase from *Mycoplasma pneumoniae*. *J Mol Biol* **326**: 1203-1217
- Alpert CA, Dörschug M, Saffen D, Frank R, Deutscher J, Hengstenberg W (1985) The bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Isolation of active site peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography and determination of their primary structure. *J Chromatography* **326**: 363-371
- Amster-Choder O (2005) The bgl sensory system: a transmembrane signaling pathway controlling transcriptional antitermination. *Curr Opin Microbiol* **8**: 127-134
- Anagnostopoulos C, Spizizen J (1961) Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746
- Barabote RD, Saier MH, Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 608-634
- Barker S, Matthews R, Lee W, Bostock A, Burnie J (1991) Identification of a Gene Encoding an Hpr-Like Protein in *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* **29**: 381-386
- Behari J, Youngman P (1998) A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* **180**: 6316-6324
- Behrens S, Mitchell WJ, Bahl H (2001) Molecular analysis of the mannitol operon of *Clostridium acetobutylicum* encoding a phosphotransferase system and a putative PTS-modulated regulator. *Microbiology* **147**: 75-86
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300
- Bertram R, Rigali S, Wood N, Lulko AT, Kuipers OP, Titgemeyer F (2011) Regulon of the N-acetylglucosamine utilization regulator NagR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**: 3525-3536

- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, ColladoVides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1469
- Boël G, Mijakovic I, Mazé A, Poncet S, Taha M-K, Larribe M, Darbon E, Khemiri A, Galinier A, Deutscher J (2003) Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 206-215
- Boer H, ten Hoeve-Duurkens RH, Schuurman-Wolters GK, Dijkstra A, Robillard GT (1994) Expression, purification, and kinetic characterization of the mannitol transport domain of the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system of *Escherichia coli*. Kinetic evidence that the *E. coli* mannitol transport protein is a functional dimer. *J Biol Chem* **269**: 17863-17871
- Bolhuis H, Palm P, Wende A, Falb M, Rampp M, Rodriguez-Valera F, Pfeiffer F, Oesterhelt D (2006) The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi* : life at the limits of water activity. *Bmc Genomics* **7**:169
- Botella E, Fogg M, Jules M, Piersma S, Doherty G, Hansen A, Denham EL, Le Chat L, Veiga P, Bailey K, Lewis PJ, van Dijl JM, Aymerich S, Wilkinson AJ, Devine KM (2010) pBaSysBioII: an integrative plasmid generating *gfp* transcriptional fusions for high-throughput analysis of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **156**: 1600-1608
- Brochu D, Vadeboncoeur C (1999) The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J Bacteriol* **181**: 709-717
- Brunker P, Hils M, Altenbuchner J, Mattes R (1998) The mannitol utilization genes of *Pseudomonas fluorescens* are regulated by an activator: cloning, nucleotide sequence and expression of the *mtlR* gene. *Gene* **215**: 19-27
- Chauvin F, Brand L, Roseman S (1994a) Sugar-Transport by the Bacterial Phosphotransferase System - Characterization of the *Escherichia-Coli* Enzyme-I Monomer/Dimer Transition Kinetics by Fluorescence Anisotropy. *J Biol Chem* **269**: 20270-20274
- Chauvin F, Brand L, Roseman S (1994b) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer equilibrium by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* **269**: 20263-20269

- Chen Q, Postma PW, Amster-Choder O (2000) Dephosphorylation of the *Escherichia coli* transcriptional antiterminator BglG by the sugar sensor BglF is the reversal of its phosphorylation. *J Bacteriol* **182**: 2033-2036
- Cornilescu G, Lee BR, Cornilescu CC, Wang G, Peterkofsky A, Clore GM (2002) Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the cytoplasmic A domain of the mannitol transporter II^{Mannitol} and HPr of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **277**: 42289-42298
- Crutz A-M, Steinmetz M, Aymerich SA, Richter R, Le Coq D (1990) Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **172**: 1043-1050
- Dean DA, Reizer J, Nikaido H, Saier MH, Jr. (1990) Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem* **265**: 21005-21010
- Débarbouillé M, Martin-Verstraete I, Klier A, Rapoport G (1991) The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both σ^{54} - and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2212-2216
- Deutscher J, Engelmann R (1984) Purification and characterization of an ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* **23**: 157-162
- Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-+
- Deutscher J, Galinier A, Martin-Verstraete I (2002) Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: From genes to cells.*, Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds), pp 129-150. Washington, D.C.: ASM Press
- Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V, Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**: 1049-1053
- Deutscher J, Reizer J, Fischer C, Galinier A, Saier MH, Jr., Steinmetz M (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the

- phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 3336-3344
- Deutscher J, Saier MH, Jr. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6790-6794
- Dossonnet V, Monedero V, Zagorec M, Galinier A, Pérez-Martínez G, Deutscher J (2000) Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr kinase/P-Ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J Bacteriol* **182**: 2582-2590
- Driks A (2002) Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci* **59**: 389-391
- Earl AM, Losick R, Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **16**: 269-275
- Egeter O, Brückner R (1996) Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol* **21**: 739-749
- El-Kabbani OAL, Waygood EB, Delbaere LTJ (1987) Tertiary structure of histidine-containing protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**: 12926-12929
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Fieulaine S, Morera S, Poncet S, Mijakovic I, Galinier A, Janin J, Deutscher J, Nessler S (2002) X-ray structure of a bifunctional protein kinase in complex with its protein substrate HPr. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13437-13441
- Fieulaine S, Morera S, Poncet S, Monedero V, Gueguen-Chaignon V, Galinier A, Janin J, Deutscher J, Nessler S (2001) X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide binding domain. *EMBO J* **20**: 3917-3927
- Figge RM, Ramseier TM, Saier MH, Jr. (1994) The Mannitol Repressor (MtlR) of *Escherichia-Coli*. *J Bacteriol* **176**: 840-847

- Fischer R, Hengstenberg W (1992) Mannitol-specific enzyme II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus carnosus*. Sequence and expression in *Escherichia coli* and structural comparison with the enzyme II^{Mannitol} of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **204**: 963-969
- Fischer R, Pogge von Strandmann R, Hengstenberg W (1991) Mannitol-specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Enterococcus faecalis*: molecular cloning and nucleotide sequences of the Enzyme III^{Mtl} gene and the mannitol-1-phosphate dehydrogenase gene, expression in *Escherichia coli*, and comparison of the gene products with similar enzymes. *J Bacteriol* **173**: 3709-3715
- Fouet A, Arnaud M, Klier A, Rapoport G (1987) *Bacillus subtilis* sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in *Escherichia coli* and homology to enzymes II from enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8773-8777
- Fraser CM, Norris SJ, Weinstock CM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**: 375-388
- Friedman SA, Hays JB (1977) Initial characterization of hexose and hexitol phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferases of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **130**: 991-999
- Galinier A, Deutscher J, Martin-Verstraete I (1999) Phosphorylation of either Crh or HPr mediates catabolite repression and binding of CcpA to the *cre* of the *Bacillus subtilis* *xyn* operon. *J Mol Biol* **286**: 307-314
- Galinier A, Haiech J, Kilhoffer M-C, Jaquinod M, Stülke J, Deutscher J, Martin-Verstraete I (1997) The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8439-8444
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer M-C, Deutscher J, Haiech J (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1823-1828
- Garrett DS, Seok Y-J, Liao D-I, Peterkofsky A, Gronenborn AM, Clore GM (1997) Solution structure of the 30 kDa N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli*

phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by multidimensional NMR. *Biochemistry* **36**: 2517-2530

Gassner M, Stehlik D, Schrecker O, Hengstenberg W, Maurer W, Rüterjans H (1977) The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. ^1H and ^{31}P nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *Eur J Biochem* **75**: 287-296

Glaser P, Kunst F, Arnaud M, Coudart MP, Gonzales W, Hullo MF, Ionescu M, Lubochinsky B, Marcelino L, Moszer I (1993) *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 degrees to 333 degrees. *Mol Microbiol* **10**: 371-384

Gonzy-Tréboul G, Steinmetz M (1987) Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: cloning of the region containing the *ptsH* and *ptsI* genes and evidence for a *crr*-like gene. *J Bacteriol* **169**: 2287-2290

Gough JA, Murray NE (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**: 1-19

Guérout-Fleury AM, Frandsen N, Stragier P (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**: 57-61

Gunnewijk MGW, Poolman B (2000) HPr(His~P)-mediated phosphorylation differently affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem* **275**: 34080-34085

Henkin TM (1996) The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 9-15

Henstra SA, Duurkens RH, Robillard GT (2000) Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J Biol Chem* **275**: 7037-7044

Henstra SA, Tolner B, ten Hoeve Duurkens RH, Konings WN, Robillard GT (1996) Cloning, expression, and isolation of the mannitol transport protein from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **178**: 5586-5591

- Henstra SA, Tuinhof M, Duurkens RH, Robillard GT (1999) The *Bacillus stearothermophilus* mannitol regulator, MtlR, of the phosphotransferase system. A DNA-binding protein, regulated by HPr and IICB^{mtl}-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* **274**: 4754-4763
- Heravi KM, Wenzel M, Altenbuchner J (2011) Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors. *Microb Cell Fact* **10**: 83
- Herzberg O, Reddy P, Sutrina S, Saier MH, Jr., Reizer J, Kapadia G (1992) Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2499-2503
- Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Inada T, Aiba H, Postma PW (1998) Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 755-765
- Honeyman AL, Curtiss III R (1992) Isolation, characterization, and nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* mannitol-phosphate dehydrogenase gene and the mannitol-specific factor III gene of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Infect Immun* **60**: 3369-3375
- Honeyman AL, Curtiss III R (2000) The mannitol-specific enzyme II (*mtlA*) gene and the *mtlR* gene of the PTS of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **146**: 1565-1572
- Huynh PL, Jankovic I, Schnell NF, Brückner R (2000) Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosum*. *J Bacteriol* **182**: 1895-1902
- Jacobson GR, Lee CA, Leonard JE, Saier MH, Jr. (1983) Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. I. Properties of the purified permease. *J Biol Chem* **258**: 10748-10756
- Jault J-M, Fieulaine S, Nessler S, Gonzalo P, Di Pietro A, Deutscher J, Galinier A (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **275**: 1773-1780
- Jia Z, Quail JW, Delbaere LTJ, Waygood EB (1994) Structural comparison of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr. *Biochem Cell Biol* **72**: 202-217
- Johnston M (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **51**: 458-476

- Jones BE, Dossonnet V, Küster E, Hillen W, Deutscher J, Klevit RE (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem* **272**: 26530-26535
- Joyet P, Derkaoui M, Poncet S, Deutscher J (2010) Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol Microbiol* **76**: 1279-1294
- Kalbitzer HR, Hengstenberg W, Rösch P, Muss P, Bernsmann P, Engelmann R, Dörschug M, Deutscher J (1982) HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochemistry* **21**: 2879-2885
- Kearns DB, Losick R (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 581-590
- Khan SR, Deutscher J, Vishwakarma R, Monedero V, Bhatnagar NB (2001) The *ptsH* gene from *Bacillus thuringiensis israelensis*. Characterization of a new phosphorylation site on the protein HPr. *Eur J Biochem* **268**: 521-530
- Kim JH, Guvener ZT, Cho JY, Chung K-C, Chambliss GH (1995) Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J Bacteriol* **177**: 5129-5134
- Kotrba P, Inui M, Yukawa H (2001) Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J Biosci Bioeng* **92**: 502-517
- Kravanja M, Engelmann R, Dossonnet V, Bluggel M, Meyer HE, Frank R, Galinier A, Deutscher J, Schnell N, Hengstenberg G (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* **31**: 59-66
- Krüger S, Gertz S, Hecker M (1996) Transcriptional analysis of *bglPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J Bacteriol* **178**: 2637-2644
- Kumar S, Smith KP, Floyd JL, Varela MF (2011) Cloning and molecular analysis of a mannitol operon of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase (PTS) type from *Vibrio cholerae* O395. *Archives of Microbiology* **193**: 201-208

- Kundig W, Ghosh S, Roseman S (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc Natl Acad Sci USA* **52**: 1067-1074
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denizot F, Devine KM, Dusterhoft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, *et al* (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256
- Landmann JJ, Busse RA, Latz JH, Singh KD, Stülke J, Görke B (2011) Crh, the paralogue of the phosphocarrier protein HPr, controls the methylglyoxal bypass of glycolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **82**: 770-787
- Le Coq D, Lindner C, Krüger S, Steinmetz M, Stülke J (1995) New β -glucoside (*bgl*) genes in *Bacillus subtilis*: the *bglP* gene product has both transport and regulatory functions similar to those of BglF, its *Escherichia coli* homolog. *J Bacteriol* **177**: 1527-1535
- Leboeuf C, Auffray Y, Hartke A (2000) Cloning, sequencing and characterization of the *ccpA* gene from *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol* **55**: 109-113
- Lee CA, Saier MH, Jr. (1983) Mannitol-specific enzyme II of the bacterial phosphotransferase system. III. The nucleotide sequence of the permease gene. *J Biol Chem* **258**: 761-767
- Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C, Kolter R (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 1-16
- Lengeler J (1975a) Mutations affecting transport of the hexitols D-mannitol, D-glucitol, and galactitol in *Escherichia coli* K-12: isolation and mapping. *J Bacteriol* **124**: 26-38
- Lengeler J (1975b) Nature and properties of hexitol transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **124**: 39-47
- Lengeler JW, Jahreis K, Wehmeier UF (1994) Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 1-28

- Lengeler JW, Titgemeyer F, Vogler AP, Wöhrl BM (1990) Structures and homologies of carbohydrate:phosphotransferase system (PTS) proteins. *Phil Trans R Soc Lond B* **326**: 489-504
- Lindner C, Galinier A, Hecker M, Deutscher J (1999) Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Mol Microbiol* **31**: 995-1006
- Lindner C, Hecker M, Le Coq D, Deutscher J (2002) *Bacillus subtilis* mutant LicT antiterminators exhibiting enzyme I- and HPr-independent antitermination affect catabolite repression of the *bglPH* operon. *J Bacteriol* **184**: 4819-4828
- Lopian L, Nussbaum-Shochat A, O'Day-Kerstein K, Wright A, Amster-Choder O (2003) The BglF sensor recruits the BglG transcription regulator to the membrane and releases it on stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7099-7104
- Mahr K, Hillen W, Titgemeyer F (2000) Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl Environ Microbiol* **66**: 277-283
- Marquez J, Reinelt S, Koch B, Engelmann R, Hengstenberg W, Scheffzek K (2006) Structure of the full-length enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 32508-32515
- Marquez JA, Hasenbein S, Koch B, Fioulaine S, Nessler S, Russell RB, Hengstenberg W, Scheffzek K (2002) Structure of the full-length HPr kinase/phosphatase from *Staphylococcus xylosus* at 1.95 Å resolution: Mimicking the product/substrate of the phospho transfer reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3458-3463
- Martin-Verstraete I, Charrier V, Stülke J, Galinier A, Erni B, Rapoport G, Deutscher J (1998) Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol Microbiol* **28**: 293-303
- Martin-Verstraete I, Débarbouillé M, Klier A, Rapoport G (1990) Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J Mol Biol* **214**: 657-671
- Martin-Verstraete I, Débarbouillé M, Klier A, Rapoport G (1994) Interaction of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J Mol Biol* **241**: 178-192

- Mesak LR, Dahl MK (2000) Purification and enzymatic characterization of PgcM: a β -phosphoglucomutase and glucose-1-phosphate phosphodismutase of *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **174**: 256-264
- Mijakovic I, Poncet S, Galinier A, Monedero V, Fieulaine S, Janin J, Nessler S, Marquez JA, Scheffzek K, Hasenbein S, Hengstenberg W, Deutscher J (2002) Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: A relic of early life? *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13442-13447
- Misset O, Brouwer M, Robillard GT (1980) *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of Enzyme I. *Biochemistry* **19**: 883-890
- Monedero V, Gosalbes MJ, Pérez-Martínez G (1997) Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J Bacteriol* **179**: 6657-6664
- Monedero V, Kuipers OP, Jamet E, Deutscher J (2001a) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **183**: 3391-3398
- Monedero V, Poncet S, Mijakovic I, Fieulaine S, Dossonnet V, Martin-Verstraete I, Nessler S, Deutscher J (2001b) Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J* **20**: 3928-3937
- Monedero V, Yebra MJ, Poncet S, Deutscher J (2008) Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. *Res Microbiol* **159**: 94-102
- Msadek T (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **7**: 201-207
- Mustachio LM, Aksit S, Mistry RH, Scheffler R, Yamada A, Liu JM (2012) The *Vibrio cholerae* mannitol transporter is regulated posttranscriptionally by the MtlS small regulatory RNA. *J Bacteriol* **194**: 598-606
- Oberholzer AE, Schneider P, Siebold C, Baumann U, Erni B (2009) Crystal structure of enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in the dephosphorylated state. *J Biol Chem* **284**: 33169-33176
- Opacic M, Vos EP, Hesp BH, Broos J (2010) Localization of the substrate-binding site in the homodimeric mannitol transporter, EII^{mtl}, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **285**: 25324-25331

- Osumi T, Saier MH, Jr. (1982) Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1457-1461
- Otte S, Lengeler JW (2001) The *mtl* genes and the mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* KAY2026. *FEMS Microbiol Lett* **194**: 221-227
- Parche S, Schmid R, Titgemeyer F (1999) The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*. Identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J Biochem* **265**: 308-317
- Pas HH, Robillard GT (1988) S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EII^{Mtl}. *Biochemistry* **27**: 5835-5839
- Peng X, Okai N, Vertes AA, Inatomi K, Inui M, Yukawa H (2011) Characterization of the mannitol catabolic operon of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 1375-1387
- Pinedo CA, Gage DJ (2009) HPrK regulates succinate-mediated catabolite repression in the Gram-negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **191**: 298-309
- Plumbridge J (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr Opin Microbiol* **5**: 187-193
- Pogge von Strandmann R, Weigt C, Fisher R, Meyer HE, Kalbitzer HR, Hengstenberg W (1995) Expression, purification and characterization of the enzyme II mannitol-specific domain from *Staphylococcus carnosus* and determination of the active-site cysteine residue. *Eur J Biochem* **233**: 116-122
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594
- Presecan-Siedel E, Galinier A, Longin R, Deutscher J, Danchin A, Glaser P, Martin-Verstraete I (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 6889-6897
- Pries A, Priefert H, Krüger N, Steinbüchel A (1991) Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly (β hydroxybutyric acid)-leaky

- phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 5843-5853
- Reiche B, Frank R, Deutscher J, Meyer N, Hengstenberg W (1988) Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: purification and characterization of the mannitol-specific enzyme III^{mtl} of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus carnosus* and homology with the Enzyme II^{mtl} of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**: 6512-6516
- Reizer J, Bachem S, Reizer A, Arnaud M, Saier MH, Jr., Stülke J (1999a) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145**: 3419-3429
- Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier MH, Jr., Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* **27**: 1157-1169
- Reizer J, Saier MH, Jr. (1997) Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 407-415
- Reizer J, Schneider B, Reizer A, Saier MH, Jr. (1999b) A hybrid response regulator possessing a PEP-dependent phosphorylation domain. *Microbiology* **145**: 987-989
- Reizer J, Sutrina SL, Wu L-F, Deutscher J, Reddy P, Saier MH, Jr. (1992) Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 9158-9169
- Richet E, Davidson AL, Joly N (2012) The ABC transporter MalFGK₂ sequesters the MalT transcription factor at the membrane in the absence of cognate substrate. *Mol Microbiol* **20**: 1365-2958
- Robillard GT, Broos J (1999) Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 73-104
- Romero-Beviar M, Martinez-Rodriguez S, Prieto J, Goormaghtigh E, Ariz U, Martinez-Chantar M, Gomez J, Neira JL (2010) The N-terminal domain of the enzyme I is a monomeric well-folded protein with a low conformational stability and residual structure in the unfolded state. *Protein engineering, design and selection* **23**: 729-742

- Saier MH, Chauvaux S, Cook GM, Deutscher J, Paulsen IT, Reizer J, Ye JJ (1996) Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology-Uk* **142**: 217-230
- Saier MH, Jr., Chauvaux S, Deutscher J, Reizer J, Ye J-J (1995) Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci* **20**: 267-271
- Saier MH, Jr., Reizer J (1994) The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**: 755-764
- Schnetz K, Stülke J, Gertz S, Krüger S, Krieg M, Hecker M, Rak B (1996) LicT, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator protein of the BglG family. *J Bacteriol* **178**: 1971-1979
- Schöck F, Dahl MK (1996) Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme II^{Tr} and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene* **175**: 59-63
- Schönert S, Seitz S, Krafft H, Feuerbaum E-A, Andernach I, Witz G, Dahl MK (2006) Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 3911-3922
- Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, Brennan RG (2007) Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol* **368**: 1042-1050
- Seok Y-J, Lee BR, Zhu P-P, Peterkofsky A (1996) Importance of the carboxyl-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system for phosphoryl donor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 347-351
- Simpson CL, Russell RR (1998) Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **66**: 2085-2092
- Spizizen J (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus-Subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**: 1072-1078
- Stülke J, Arnaud M, Rapoport G, Martin-Verstraete I (1998) PRD - a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* **28**: 865-874

- Stülke J, Hillen W (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* **54**: 849-880
- Stülke J, Martin-Verstraete I, Zagorec M, Rose M, Klier A, Rapoport G (1997) Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* **25**: 65-78
- Sugiyama JE, Mahmoodian S, Jacobson GR (1991) Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* mannitol permease by using a nested-deletion method to create *mtIA-phoA* fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9603-9607
- Suh J-Y, Cai M, Williams Jr DC, Clore GM (2006) Solution structure of a post-transition state analog of the phosphotransfer reaction between the A and B cytoplasmic domains of the mannitol transporter IIMannitol of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 8939-8949
- Sun T, Altenbuchner J (2010) Characterization of a mannose utilization system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**: 2128-2139
- Tanaka Y, Kimata K, Aiba H (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J* **19**: 5344-5352
- Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier MH, Jr. (2001) The complete phosphotranferase system in *Escherichia coli*. *J MolMicrobiol Biotechnol* **3**: 329-346.
- Teplyakov A, Lim K, Zhu P-P, Kapadia G, Chen CCH, Schwartz J, Howard A, Reddy PT, Peterkofsky A, Herzberg O (2006) Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 16218-16223
- Thompson J, Turner KW, Thomas TD (1978) Catabolite inhibition and sequential metabolism of sugars by *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* **133**: 1163-1174
- Titgemeyer F, Mason RE, Saier MH, Jr. (1994) Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* **176**: 543-546
- Tobisch S, Glaser P, Krüger S, Hecker M (1997) Identification and characterization of a new β glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **179**: 496-506

- Tortosa P, Declerck N, Dutartre H, Lindner C, Deutscher J, Le Coq D (2001a) Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol Microbiol* **41**: 1381-1393
- Tortosa P, Le Coq D (1995) A ribonucleic antiterminator sequence (RAT) and a distant palindrome are both involved in sucrose induction of the *Bacillus subtilis* sacXY regulatory operon. *Microbiology* **141**: 2921-2927
- Tortosa P, Logsdon L, Kraigher B, Itoh Y, Mandic-Mulec I, Dubnau D (2001b) Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *J Bacteriol* **183**: 451-460
- Tran LSP, Nagai T, Itoh Y (2000) Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **37**: 1159-1171
- Turinsky AJ, Grundy FJ, Kim J-H, Chambliss GH, Henkin TM (1998) Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis* *ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J Bacteriol* **180**: 5961-5967
- Vadeboncoeur C, Brochu D, Reizer J (1991) Quantitative determination of the intracellular concentration of the various forms of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in growing cells of oral streptococci. *Anal Biochem* **196**: 24-30
- van Weeghel RP, Meyer G, Pas HH, Keck W, Robillard GT (1991a) Cytoplasmic phosphorylating domain of the mannitol-specific transport protein of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*: overexpression, purification, and functional complementation with the mannitol binding domain. *Biochemistry* **30**: 9478-9485
- van Weeghel RP, van der Hoek YY, Pas HH, Elferink M, Keck W, Robillard GT (1991b) Details of mannitol transport in *Escherichia coli* elucidated by site-specific mutagenesis and complementation of phosphorylation site mutants of the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol-specific phosphotransferase system. *Biochemistry* **30**: 1768-1773
- Viana R, Monedero V, Dossonnet V, Vadeboncoeur C, Pérez-Martínez G, Deutscher J (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: Their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* **36**: 570-584

- Warner JB, Lolkema JS (2003) A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 277-280.
- Watanabe S, Hamano M, Kakeshita H, Bunai K, Tojo S, Yamaguchi H, Fujita Y, Wong SL, Yamane K (2003) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtlD) is required for mannitol and glucitol assimilation in *Bacillus subtilis*: possible cooperation of *mtl* and *gut* operons. *J Bacteriol* **185**: 4816-4824
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346
- Weickert MJ, Chambliss GH (1990) Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6238-6242
- Weigel N, Kukuruzinska MA, Nakazawa A, Waygood EB, Roseman S (1982) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by Enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**: 14477-14491
- Wittekind M, Rajagopal P, Branchini BR, Reizer J, Saier MH, Jr., Klevit RE (1992) Solution structure of the phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* by two-dimensional NMR spectroscopy. *Protein Sci* **1**: 1363-1376
- Wittekind M, Reizer J, Deutscher J, Saier MH, Jr., Klevit RE (1989) Common structural changes accompany the functional inactivation of HPr by seryl phosphorylation or by serine to aspartate substitution. *Biochemistry* **28**: 9908-9912
- Wolff JB, Kaplan NO (1956) D-Mannitol 1-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **218**: 849-869
- Ye J-J, Neal JW, Cui X, Reizer J, Saier MH, Jr. (1994) Regulation of the glucose:H⁺ symporter by metabolite-activated ATP-dependent phosphorylation of HPr in *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* **176**: 3484-3492
- Ye J-J, Saier MH, Jr. (1995) Cooperative binding of lactose and the phosphorylated phosphocarrier HPr(Ser-P) to the lactose/H⁺ symport permease of *Lactobacillus brevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 417-421
- Zhu P-P, Reizer J, Reizer A, Peterkofsky A (1993) Unique monocistronic operon (*ptsH*) in *Mycoplasma capricolum* encoding the phosphocarrier protein, HPr, of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Cloning, sequencing, and characterization of *ptsH*. *J Biol Chem* **268**: 26531-26540

Zhu PP, Szczepanowski RH, Nosworthy NJ, Ginsburg A, Peterkofsky A (1999) Reconstitution studies using the helical and carboxy-terminal domains of enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **38**: 15470-15479

Zukowski MM, Miller L, Cogswell P, Chen K, Aymerich S, Steinmetz M (1990) Nucleotide sequence of the *sacS* locus of *Bacillus subtilis* reveals the presence of two regulatory genes. *Gene* **90**: 153-155

Summary

The *Bacillus subtilis mtl* operon encodes the enzymes necessary for mannitol utilization. Its expression is controlled by MtlR, a transcriptional activator belonging to the DeoR family. MtlR contains a HTH domain followed by two PTS regulation domains (PRDs), an EIIB^{Gat} domain and an EIIA^{Mtl}-like domain.

The general mechanism of the regulation of MtlR activity is based on its phosphorylation by components of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS). The phosphorylation of EIIB^{Gat} on cysteine 419 by P~EIIA^{Mtl} has a major negative effect on the activity of MtlR. The absence of EIIA^{Mtl} in a $\Delta mtlF$ mutant therefore leads to constitutively active MtlR.

In this study a new mechanism of MtlR regulation based on the interaction of the PTS component EIIB^{Mtl} with MtlR is presented.

We observed that the deletion of the entire *mtlAFD* operon or of *mtlF* and only the 3'-part of *mtlA* (encoding the EIIB^{Mtl} domain) abolishes the constitutive MtlR activity of the $\Delta mtlF$ mutant, suggesting that MtlR activity depends on functional EIIB^{Mtl}. By carrying out yeast two-hybrid experiments we could establish a direct, specific and bidirectional interaction between EIIB^{Mtl} and the EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like part of MtlR.

Complementation of the above mutants was possible with entire MtlA, but not with the EIIB^{Mtl} domain. EIIB^{Mtl} is normally fused to the membrane protein EIIC^{Mtl}; we therefore fused EIIB^{Mtl} to another membrane, which indeed restored MtlR function in the absence of EIIC^{Mtl}. The EIIC^{Mtl} domain is therefore not essential for the interaction between EIIB^{Mtl} and MtlR; it is rather the vicinity of the membrane which is required for the activation of MtlR.

A regulation model of MtlR activity is proposed. In this model, the MtlR-mediated induction of the *mtlAFD* operon requires the phosphorylation of PRDII by P~His-HPr and the dephosphorylation of EIIB^{Gat} by EIIA^{Mtl}. The presence of unphosphorylated EIIB^{Mtl}, which prevails when the inducer mannitol is present, is also required. Under these conditions unphosphorylated EIIB^{Mtl} sequesters MtlR dephosphorylated on cysteine 419, but phosphorylated at His-342, to the membrane thereby activating the transcription activator, which leads to increased expression of the *mtlAFD* operon.

Keywords: *Bacillus subtilis*, mannitol operon, MtlR, EIIB^{Mtl}, membrane sequestration

Résumé

Chez *Bacillus subtilis* l'expression de l'opéron *mtl* pour l'utilisation du mannitol est contrôlé par MtlR. MtlR est un activateur transcriptionnel qui appartient à la famille des régulateurs DeoR composé d'un domaine HTH suivi de deux PRDs, un domaine EIIB^{Gat} et un domaine EIIA^{Mtl}-like.

Le mécanisme général de la régulation de l'activité de MtlR est basé sur sa phosphorylation par des composants du PTS. La phosphorylation sur la Cystéine 419 du domaine EIIB^{Gat} par P~EIIA^{Mtl} a un effet négatif majeur sur l'activité de MtlR. Par conséquent, dans un mutant $\Delta mtlF$ où EIIA^{Mtl} est délétee MtlR est constitutivement actif.

Dans cette étude nous avons mis en évidence un nouveau phénomène de régulation de MtlR impliquant la protéine du PTS, EIIB^{Mtl}.

Nous avons observé que lorsque on délète l'opéron *mtl* ou EIIB^{Mtl} et EIIA^{Mtl}, l'activité constitutive de MtlR dans un mutant $\Delta mtlF$ déjà observée est abolie d'où notre hypothèse que EIIB^{Mtl} aura un effet sur l'activité de MtlR. Par des expériences de double hybride nous avons montré une interaction directe, spécifique et bidirectionnelle entre les deux protéines EIIB^{Mtl} et EIIB^{Gat}EIIA^{Mtl}-like de MtlR.

D'une manière comparable à la cellule où EIIB^{Mtl} est fusionnée à la protéine EIIC^{Mtl} nous avons démontré que seulement la forme EIIB^{Mtl} fusionné à la perméase EIIC^{Mtl} est capable d'activer MtlR mais nous avons également démontré que ce n'est pas EIIC^{Mtl} qui est essentielle à l'interaction entre EIIB^{Mtl} et MtlR mais c'est le voisinage de la membrane qui est essentielle pour l'établissement de cette interaction et l'activation de MtlR

Un modèle de régulation de l'activité du régulateur MtlR est proposé. Dans ce modèle l'induction de l'opéron *mtl* via l'activation de MtlR requiert la phosphorylation de PRDII de MtlR par P~His-HPr, la déphosphorylation de EIIB^{Gat} de MtlR par EIIA^{Mtl} et la présence de la forme non-phosphorylée de l'EIIB^{Mtl} qui est dominante en présence du substrat inducteur, le mannitol. Ainsi, l'EIIB^{Mtl} non-phosphorylée séquestre MtlR déphosphorylé sur sa cystéine 419 à la membrane, l'active et induit l'expression de l'opéron *mtl*.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, l'opéron mannitol, MtlR, EIIB^{Mtl}, séquestration à la membrane