

DENIS ROY

Rôles et fonctions de HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C de la classe des *Bacilli* ainsi que l'identification des gènes sous le contrôle de HPr(His~P) chez *Streptococcus salivarius* obtenue par analyse protéomique

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biochimie
pour l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

HPr est une protéine du système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase impliquée dans le transport, la régulation d'enzymes et de transporteurs et la régulation de la transcription de certains gènes. La protéine HPr peut être retrouvée sous quatre formes différentes. Elle peut être phosphorylée sur un résidu histidyl par l'enzyme I pour former HPr(His~P). Sous cette forme, HPr peut, entre autres, contrôler par phosphorylation certains régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD. Chez les bactéries à Gram positif, HPr peut être phosphorylée sur un résidu séryl par la HPr kinase/phosphorylase. Le produit formé, HPr(Ser-P), est impliqué dans la répression catabolique selon un mécanisme impliquant la formation d'un complexe entre HPr(Ser-P), la protéine CcpA et une séquence spécifique d'ADN située dans la région promotrice des opérons cibles, la séquence *cre*. HPr(Ser-P) est également impliquée dans le phénomène d'exclusion d'inducteur. Enfin, des taux importants de HPr(Ser-P)(His~P) ont été détectés chez *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* et *Streptococcus thermophilus*.

Afin de caractériser HPr(Ser-P)(His~P), nous avons vérifié si certaines bactéries de la classe des *Bacilli* pouvaient produire et maintenir des taux importants de HPr(Ser-P)(His~P) et vérifié si HPr(Ser-P)(His~P) pouvait participer au transport des sucres. Les quantifications de HPr ont été effectuées par immunoélectrophorèse croisée et la capacité de HPr(Ser-P)(His~P) à phosphoryler les enzymes IIAB^{Man} et la glycérol kinase ont été étudiées. Des taux importants de HPr(Ser-P)(His~P) ont été détectés chez toutes les souches de streptocoques et lactocoques testées mais pas chez *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. HPr(Ser-P)(His~P) était en mesure de transférer son groupement phosphoryle aux enzymes IIAB^{Man} mais pas à la glycérol kinase,

suggérant que HPr(Ser-P)(His~P) participe au transport des sucres PTS mais ne serait pas impliquée dans le contrôle de l'activité de la glycérol kinase.

Nous avons finalement étudié le rôle de HPr(His~P) dans la régulation de la transcription chez *Streptococcus salivarius* via une étude comparative des protéomes de la souche parentale ATCC 25975 et du mutant G71, une souche EI, incapable de produire HPr(His~P). Les analyses protéomiques différentielles ont été réalisées à partir d'extraits provenant de cellules récoltées en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Chez les cellules récoltées en phase stationnaire de croissance, l'analyse des profils protéiques a révélé que 1% à 2% des protéines étaient exprimées différemment chez *S. salivarius* G71 suggérant que HPr(His~P) serait impliquée dans le contrôle de l'expression de gènes chez les streptocoques.

Remerciements

Entreprendre des études doctorales n'est pas une mince affaire... J'en suis à rédiger mes remerciements et je suis encore submergé par l'ampleur de la tâche que j'ai réussi à traverser. Ce travail, je l'ai fait, personne ne peut le nier, par contre, il aurait été impensable d'en arriver ici sans le support, l'amitié et des encouragements constants et ce, jusqu'à la toute fin, bon temps, mauvais temps. C'est donc ces personnes que je désire remercier ici.

Christian Vadeboncoeur, vous m'avez accueilli dans votre laboratoire. Juste pour cela, vous méritez mes remerciements les plus sincères. J'ai toujours voulu être à la hauteur même si parfois j'ai eu l'impression que c'était inatteignable. Vous m'avez appris la rigueur et l'intégrité intellectuelle. Ces qualités resteront avec moi toujours et font de moi une meilleure personne autant d'un point de vue professionnel que personnel. Je ne pourrai jamais vous dire toute ma gratitude.

Michel Frenette, vous avez été pour moi un guide, un mentor et, j'ose le dire, un ami. Vous étiez toujours disponible pour écouter mes théories, des plus élaborées aux plus farfelues. Vous avez ouvert mon champ d'horizon en me forçant régulièrement à considérer des voies de raisonnement alternatives. J'ai beaucoup apprécié votre présence et votre support. De concert avec Christian Vadeboncoeur, vous avez fait de moi le biochimiste que je suis aujourd'hui. Merci milles fois.

Sylvain Moineau et Yves Bourbonnais ensemble, vous avez complété mon comité aviseur. Je n'ai pas eu le privilège de vous côtoyer régulièrement mais vos commentaires, lors de nos rencontres, ont toujours su m'aiguiller vers de nouvelles pistes qui m'ont permis de fournir un travail de meilleure qualité. Merci. Je voudrais ajouter une mention spéciale à

Sylvain Moineau qui a accepté, malgré un horaire plus que chargé, de faire la prélecture de ma thèse.

Tout au long de mes études, j'ai eu la chance de me faire des amis dont certains, je n'en doute pas, le demeureront pour encore plusieurs années! Katy Vaillancourt, merci de ta générosité, de ta bonne humeur et de ton amitié. Avec Marie-Claude Jobin et Jean-Dominique LeMay (oui! bébé oui!!!), vous avez certainement été mes amis les plus fidèles. Merci à Denis Brochu, cette banque de connaissance hallucinante! Merci aux collègues que j'ai croisés, le temps d'une maîtrise, d'un stage ou d'un doctorat, je pense particulièrement au Christian Lessard, Nathalie Bédard, Mutarotase, Marie-Eve Ouellet, Jonathan Huot, Christian Bart, Josianne Veer, Israël Casabon et Marie-Pierre Bertrand-Duchesne de ce monde!

Merci à mes amis et au Onatchiway Club, Mireille Marcotte, Rémi Hébert, Martin Cossette, Michel Roy, Sébastien Fafard et j'en passe... À défaut de tous vous nommer, sachez que je vous apprécie tous!

Merci tout particulier à mes parents ainsi qu'à mon frère pour avoir été présents depuis le début de cette Odyssée, de m'avoir encouragé et de m'avoir supporté. Merci à Martin Lacasse, Hélène Nadon, Mélanie Lacasse et Michèle Lacasse (la plus meilleure marraine du monde!!!), vous faites partie de ma vie, vous êtes ma famille.

Je voudrais enfin souligner la présence constante à mes côtés de ma conjointe, Chantal Lacasse et de notre fils, Olivier... Je vous aime plus que tout au monde... Cette thèse, je vous la dédie.

Publications, communications et contributions

Au cours de mes études, j'ai eu la chance et le privilège de participer à l'élaboration et à la mise en œuvre d'études scientifiques. Certains des résultats présentés ici ont d'ailleurs fait l'objet de publications ou de communications scientifiques.

Voici une liste complète des différents articles pour lesquels j'ai été co-auteur ainsi qu'une courte description de ma contribution à ces derniers suivi d'une liste des communications que j'ai faites lors de congrès scientifiques.

Publications :

Denis J. Roy, Israël Casabon, Katy Vaillancourt, Jonathan L. Huot, Christian Vadeboncoeur, Streptococci and lactococci synthesize large amounts of HPr(Ser-P)(His~P). *Can. J. Microbiol.* 2008, **54(11)** : 941-949.

DJR a effectué la plupart des travaux en laboratoire : immunoélectrophorèse croisée, immunobuvardage Western, synthèse de PEP[³²P], clonage, purification de protéines, production d'anticorps et divers expériences de phosphorylation. Il a participé à l'élaboration et à la coordination de l'étude et a participé à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Armelle Cochu, Denis Roy, Katy Vaillancourt, Jean-Dominique LeMay, Israël Casabon, Michel Frenette, Sylvain Moineau, Christian Vadeboncoeur, The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser-P)(His~P), is abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His~P). *App. Environ. Microbiol.*, 2005, **71(3)**: 1364-1372.

DR a effectué les différentes expériences d'immunoélectrophorèses croisées, a participé à la synthèse de PEP[³²P] et a participé à la rédaction du manuscrit.

Christian Lessard, Armelle Cochou, Jean-Dominique LeMay, Denis Roy, Katy Vaillancourt, Michel Frenette, Sylvain Moineau, Christian Vadeboncoeur, Phosphorylation of *Streptococcus salivarius* lactose permease (LacS) by HPr(His~P) and HPr(Ser-P)(His~P) and effects on growth. *J. Bacteriol.*, 2003, **185(23)**: 6764-6772.

DR a effectué différentes expériences de phosphorylation, a participé à la synthèse de PEP[³²P] et a participé à la rédaction du manuscrit.

Communications :

Denis Roy, Israël Casabon, Christian Vadeboncoeur, HPr(Ser-P)(His~P) in low G+C Gram-positive bacteria., 57^{ième} congrès annuel, Société canadienne des microbiologistes, 17-20 juin 2007, Québec, Québec, Canada, C-34.

Denis Roy, Israël Casabon, Jonathan Huot, Christian Vadeboncoeur, Presence and functions of HPr(Ser-P)(His~P) in low G+C Gram-positive bacteria., 105th general meeting, American Society for Microbiology, 5-9 juin 2005, Atlanta, Georgie, États-Unis, K-010.

Denis J. Roy, Michel Frenette, Christian Vadeboncoeur, Gene regulation by HPr(His~P) in *Streptococcus salivarius*., 104th general meeting, American Society for Microbiology, 23-27 mai 2004, Nouvelle Orléans, Louisianne, États-Unis, H-062.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Publications, communications et contributions.....	vi
Table des matières	viii
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xv
Liste des abréviations	xvii
CHAPITRE 1	1
Introduction.....	1
1.1 Généralité.....	1
1.2 Systèmes de transport	3
1.2.1 Canaux et pores transmembranaires.....	3
1.2.2 Transporteurs secondaires.....	5
1.2.2.1 Major Facilitator Superfamily (MFS)	6
1.2.2.2 Autres familles de transporteurs secondaires	11
1.2.3 Transporteurs primaires	12
1.3 Système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase.....	14
1.3.1 L'enzyme I.....	16
1.3.2 Les complexes d'enzymes II.....	18
1.3.3 HPr.....	24
1.3.3.1 HPr(His~P)	24
1.3.3.1.1 Contrôle de l'activité enzymatique <i>via</i> HPr(His~P).....	26
1.3.3.1.2 Le transporteur du lactose LacS et le contrôle de son activité <i>via</i> HPr(His~P).....	27
1.3.3.1.3 Régulation de l'expression des gènes <i>via</i> HPr(His~P)	29
1.3.3.2 HPr(Ser-P)	38
1.3.3.2.1 L'exclusion et l'expulsion d'inducteur.....	39
1.3.3.2.2 Régulation de l'expression des gènes <i>via</i> HPr(Ser-P)	41
1.3.3.3 HPr(Ser-P)(His~P).....	44
1.4 Objectifs et hypothèses	46
CHAPITRE 2.....	49

Matériel et Méthodes	49
2.1 Souches bactériennes et conditions de croissance.....	49
2.2 Préparation des fractions solubles et membranaires	51
2.3 Préparation de cellules de <i>E. coli</i> électrocompétentes	52
2.4 Synthèse de PEP[³² P].....	52
2.5 Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr.....	53
2.5.1 Immunoélectrophorèse croisée.....	54
2.5.2 Immunobuvardage de type Western.....	56
2.6 Production d'anticorps	56
2.7 Purification et manipulation de l'ADN	57
2.8 Clonage du gène <i>manH</i>	58
2.9 Purification de protéines	58
2.9.1 Purification de HPr de <i>S. aureus</i>	58
2.9.2 Purification des protéines recombinantes de <i>S. salivarius</i> et <i>B. subtilis</i>	59
2.9.3 Purification des protéines recombinantes de <i>E. casseliflavus</i>	60
2.10 Caractérisation des enzymes recombinantes IIAB ^{Man}	61
2.11 Vérification des activités de HprK/P de <i>B. subtilis</i>	63
2.12 Synthèse de His ₆ -HPr(Ser-P)	63
2.13 Phosphorylation de His ₁₀ -IIAB _L ^{Man} et His ₁₀ -IIAB _H ^{Man} par His ₆ -HPr(His~ ³² P), His ₆ -HPr(Ser-P)(His~ ³² P) et His ₆ -HPr(S46D)(His~ ³² P)	64
2.14 Phosphorylation de His ₁₀ -IIAB _L ^{Man} et His ₁₀ -IIAB _H ^{Man} par His ₆ -HPr(His~P) et His ₆ -HPr(Ser-P)(His~P), mesurée par spectrophotométrie.....	65
2.15 Phosphorylation de His ₆ -GlpK de <i>E. casseliflavus</i> par His ₆ -HPr(His~ ³² P) et His ₆ -HPr(Ser-P)(His~ ³² P) de <i>S. salivarius</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>E. casseliflavus</i>	66
2.16 Dosage protéique	67
2.17 Dosage de l'activité EII-maltose et EII-glucose de <i>S. salivarius</i> , mesurée par spectrophotométrie	67
2.18 Électrophorèse sur gel à deux dimensions	67
2.19 Détermination de la séquence de peptides par LC/MS/MS	69
2.20 Purification et manipulation de l'ARN	70
2.21 Analyse de type Northern	71
CHAPITRE 3	72
Au sujet de HPr(Ser-P)(His~P)	72
3.1 HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries de la classe des <i>Bacilli</i>	72
3.1.1 Présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez des bactéries de la classe des <i>Bacilli</i>	73
3.1.1.1 Purification de HPr de <i>S. aureus</i> en vue de produire des anticorps.....	73
3.1.1.2 Sensibilité des souches à la gramicidine D ou à un autre ionophore.....	75
3.1.1.3 Détermination par immunoélectrophorèse croisée des différentes formes de HPr chez diverses espèces bactériennes de la classe des <i>Bacilli</i>	76
3.1.1.4 Détermination par immunobuvardage de type Western des différentes formes de HPr chez diverses espèces bactériennes de la classe des <i>Bacilli</i>	80
3.1.1.5 HPr(Ser-P)(His~P) chez les lactobacilles	81
3.1.1.6 Importance et effet de l'acidification intracellulaire	82
3.1.1.6.1 Détermination des différentes formes de HPr chez <i>S. salivarius</i> en absence d'acidification intracellulaire	82
3.1.1.6.2 Effet de l'acidification sur la HprK/P chez <i>B. subtilis</i>	82
3.2 Rôle de HPr(Ser-P)(His~P).....	84
3.2.1 Étape préliminaire	84
3.2.1.1 Synthèse de phosphoénolpyruvate marqué au ³² P	84
3.2.1.2 Purification des protéines recombinantes EI, HPr et HPr(S46D) de <i>S. salivarius</i>	87
3.2.1.3 Synthèse de HPr(Ser-P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P).....	88
3.2.1.4 Purification des protéines recombinantes GlpK et HPr de <i>E. casseliflavus</i>	89
3.2.1.5 Clonage de l'enzyme recombinante IIAB _H ^{Man}	90

3.2.1.6	Purification des enzymes recombinantes IIAB _L ^{Man} et IIAB _H ^{Man}	91
3.2.1.7	Vérification de l'activité des enzymes recombinantes IIAB _L ^{Man} et IIAB _H ^{Man}	92
3.2.2	Phosphorylation des EI ^{Man} par HPr(Ser-P)(His~P)	94
3.2.2.1	Phosphorylation des protéines IIAB ^{Man} du PTS mannose de <i>S. salivarius</i> par HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P)	94
3.2.2.2	Vitesse de phosphorylation de IIAB _L ^{Man} et IIAB _H ^{Man} par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P)	95
3.2.3	Phosphorylation de la glycérol kinase de <i>E. casseliflavus</i> par HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P)	98
3.3	Résumé des principaux résultats du chapitre 3	100

CHAPITRE 4

102

HPr(His~P) chez *S. salivarius*

102

4.1	Rôle de HPr(His~P) chez les streptocoques et les lactocoques	102
4.1.1	Caractérisation du mutant <i>S. salivarius</i> G71	103
4.1.1.1	Détermination des séquences de l'opéron <i>ptsHI</i> et du gène <i>ccpA</i> chez <i>S. salivarius</i> G71 ..	104
4.1.1.2	Caractérisation de la croissance chez <i>S. salivarius</i> G71	104
4.1.2	Détermination de la présence d'un PTS maltose chez <i>S. salivarius</i>	105
4.1.3	Détermination des différentes formes de HPr chez <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et G71	106
4.1.4	Analyse de type Northern	108
4.1.4.1	Dosage des ARN messagers de l'opéron <i>pts</i> chez les deux souches de <i>S. salivarius</i>	108
4.1.5	Analyse des protéomes de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et G71	111
4.1.5.1	Analyse protéomique de <i>S. salivarius</i> récoltée en phase exponentielle de croissance	111
4.1.5.2	Analyse protéomique de <i>S. salivarius</i> récoltée en phase stationnaire de croissance	114
4.1.6	Analyse protéomique de <i>S. salivarius</i> par électrophorèse différentielle	119
4.2	Résumé des principaux résultats du chapitre 4	122

CHAPITRE 5

124

Discussion

124

5.1	Au sujet de HPr(Ser-P)(His~P)	124
5.1.1	Bref rappel	124
5.1.2	HPr(Ser-P)(His~P) : un intermédiaire ignoré	126
5.1.3	Présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C ..	126
5.1.3.1	Détermination des différentes formes de HPr chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C	126
5.1.3.2	Aux sujets des méthodes et des conditions de détermination des différentes formes de HPr	129
5.1.3.2.1	Impact de l'acidification intracellulaire sur la détermination des différentes formes de HPr	130
5.1.3.2.2	Analyse Western <i>versus</i> immunoélectrophorèse croisée	131
5.1.3.2.3	Effet du temps utilisé pour la préparation des extraits cellulaires sur les quantités des différentes formes de HPr mesurées	133
5.1.3.2.4	Inactivation des enzymes EI et HPrK/P à pH acide	134
5.1.4	Rôle de HPr(Ser-P)(His~P)	135
5.1.4.1	Transport	136
5.1.4.2	Régulation de l'activité enzymatique	138
5.2	Régulation de l'expression génétique par HPr(His~P) chez <i>S. salivarius</i>	140
5.2.1	Bref rappel	140
5.2.2	Approche méthodologique	140
5.2.2.1	Caractérisation du mutant <i>S. salivarius</i> G71	140
5.2.2.2	À propos de HPr(Ser-P)	142
5.2.2.3	Analyse des protéomes par électrophorèse 2D	142
5.2.2.4	Analyse des protéomes par la méthode DiGe	144

5.2.3	Contrôle de l'expression des gènes chez les cellules récoltées en phase exponentielle de croissance.....	145
5.2.3.1	Précision quant aux rôles de HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et des enzymes II dans le contrôle de l'expression des gènes durant la phase exponentielle de croissance	148
5.2.4	Contrôle de l'expression des gènes chez les cellules récoltées en phase stationnaire de croissance.....	150
5.2.4.1	Métabolisme et transport des sucres	153
5.2.4.2	Régulation et biosynthèse des nucléotides.....	155
5.2.4.3	Biosynthèse des acides aminés.....	157
5.2.4.4	Contrôle autogène de l'opéron <i>pts</i> ?.....	158
5.3	Conclusion	161
5.4	Perspectives	165
	Bibliographie.....	166

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des quatre principales classes de transporteurs.....	2
Figure 2 : Présentation des différentes familles de bactéries à Gram positif faisant partie du <i>phylum</i> des <i>Firmicutes</i>	3
Figure 3 : Structure tridimensionnelle du canal transmembranaire GlpF de <i>E. coli</i>	5
Figure 4 : Représentation schématique des différents modes de transport de type secondaire.....	6
Figure 5 : Structure tridimensionnelle du transporteur OxIT.....	9
Figure 6 : Superposition des structures de LacY et GlpT.....	10
Figure 7 : Représentation schématique du modèle de transport par accès alternatif.....	11
Figure 8 : Structure du transporteur de la vitamine B ₁₂ de <i>E. coli</i>	13
Figure 9 : Représentation schématique du système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase.....	15
Figure 10 : Représentation schématique d'une cinétique enzymatique de type ping-pong.....	18
Figure 11 : Représentation schématique du modèle de l'évolution des différents transporteurs (domaines IIC) de la superfamille GFL.....	20
Figure 12 : Structure des EII de la famille glucitol.....	22
Figure 13 : Rôle de HPr(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C.....	25
Figure 14 : Modèle de l'interaction entre le transporteur et le domaine IIA de LacS chez <i>S. thermophilus</i>	29
Figure 15 : Régulateurs de type PRD.....	31

Figure 16 : Antitermineur LicT de <i>B. subtilis</i>	34
Figure 17 : Représentation schématique de l'antitermination <i>via</i> un régulateur de type PRD.....	35
Figure 18 : Rôles de HPr(Ser-P) chez les bactéries à faible contenu en G+C.....	39
Figure 19 : Réaction de synthèse du PEP à partir de l'oxaloacétate et de la PEP carboxykinase.	53
Figure 20 : Représentation schématique des étapes clés de l'immunoélectrophorèse croisée.	55
Figure 21 : Phosphorylation des enzymes IIAB ^{Man} <i>via</i> la réaction couplée EI-LDH.....	66
Figure 22 : Purification de la protéine HPr de <i>S. aureus</i>	75
Figure 23 : Effet de la gramicidine D sur la croissance de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975.	76
Figure 24 : Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr chez <i>S. pneumoniae</i> R800 par immunoélectrophorèse croisée.	77
Figure 25 : Détermination de l'activité kinase et phosphorylase de la HprK/P de <i>B. subtilis</i>	83
Figure 26 : Synthèse de PEP[³² P].	86
Figure 27 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes HPr, HPr(S46D) et EI de <i>S. salivarius</i>	87
Figure 28 : Essais de phosphorylation aux dépens du PEP effectués avec différents lots de HPr(Ser-P) synthétisés en laboratoire.....	88
Figure 29 : Synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) de <i>S. salivarius</i>	89
Figure 30 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes purifiées HPr et GlpK de <i>E. casseliflavus</i>	90
Figure 31 : Représentation de la région promotrice codant pour le gène <i>manH</i> du plasmide pDR3.	91
Figure 32 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes IIAB _H ^{Man} et IIAB _L ^{Man} de <i>S. salivarius</i>	92
Figure 33 : Vérification de la phosphorylation réversible des enzymes recombinantes IIAB ^{Man}	93

Figure 34 : Phosphorylation de IIAB _H ^{Man} et IIAB _L ^{Man} par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P).....	95
Figure 35 : Vitesses de phosphorylation de IIAB _H ^{Man} et de IIAB _L ^{Man} de <i>S. salivarius</i> par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P).....	97
Figure 36 : Phosphorylation des enzymes IIAB _L ^{Man} de <i>S. salivarius</i> et GlpK de <i>E. casseliflavus</i> par HPr(His~P).....	99
Figure 37 : Phosphorylation des enzymes IIAB _L ^{Man} de <i>S. salivarius</i> et GlpK de <i>E. casseliflavus</i> par HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P).....	100
Figure 38 : Mutation du gène <i>ptsI</i> chez <i>S. salivarius</i> G71.....	103
Figure 39 : Essai de phosphorylation de HPr de <i>S. salivarius</i> aux dépens du PEP en présence d'extraits cytoplasmiques de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 (puits 1) et de <i>S. salivarius</i> G71 (puits 2).....	104
Figure 40 : Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr chez <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et G71.....	107
Figure 41 : Représentation schématique de l'opéron <i>pts</i>	109
Figure 42 : Analyse de type Northern des ARN totaux de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et du mutant G71 à l'aide d'une sonde spécifique à <i>ptsH</i>	110
Figure 43 : Protéomes de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et du mutant G71 en phase exponentielle de croissance.....	113
Figure 44 : Protéomes de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et du mutant G71 en phase stationnaire de croissance obtenus par électrophorèse 2D.....	116
Figure 45 : Protéomes de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et du mutant G71 en phase stationnaire de croissance obtenus par la méthode d'analyse DiGE.....	120
Figure 46 : Arbre consensus calculé par l'algorithme Weighbor (47) basé sur les séquences de l'ARN ribosomal 16S de bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C (58).....	129
Figure 47 : Alignement des séquences en acides aminés de domaines IIA.....	137
Figure 48 : Alignement complet des séquences en acides aminés des HPr de <i>B. subtilis</i> (<i>B. s.</i>), <i>E. casseliflavus</i> (<i>E. c.</i>) et <i>S. salivarius</i> (<i>S. s.</i>).....	139
Figure 49 : Facteurs cinétiques influençant la concentration cellulaire et le taux de synthèse d'une protéine.....	161

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste complète des familles de la « <i>major facilitator superfamily</i> ^a »	7
Tableau 2 : Souches et plasmides	50
Tableau 3 : Conditions des amplifications en chaîne par polymérase.....	57
Tableau 4 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunoélectrophorèse croisée	78
Tableau 5 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunoélectrophorèse croisée à partir d'extraits protéiques ayant été centrifugés pendant 90 minutes	79
Tableau 6 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunobuvardage de type Western .81	
Tableau 7 : Proportions relatives des différentes formes de HPr mesurées par immunoélectrophorèse croisée sur des cellules dont la croissance a été arrêtée sans acidification du milieu intracellulaire	82
Tableau 8 : Temps de génération de <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et du mutant G71	105
Tableau 9 : Activité EII pour le maltose et le glucose en présence de membranes de <i>S. salivarius</i> A37	106
Tableau 10 : Proportions des différentes formes de HPr chez <i>S. salivarius</i> 25975 et le mutant G71 mesurées par immunoélectrophorèse croisée	108
Tableau 11 : Protéines exprimées de façon différente chez <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et G71 récoltées en phase exponentielle de croissance.	114
Tableau 12 : Protéines exprimées de façon différente chez <i>S. salivarius</i> ATCC 25975 et G71 récoltées en phase stationnaire de croissance.	117

Tableau 13 : Protéines exprimées de façon différente chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71 récoltées en phase stationnaire de croissance après analyse par DiGE 121

Tableau 14 : Protéines dont l'expression est modifiée chez les cellules du mutant G71 récoltées en phase exponentielle de croissance 146

Tableau 15 : Protéines dont l'expression est modifiée chez des cellules du mutant G71 récoltées en phase stationnaire de croissance 152

Liste des abréviations

2D	deux dimensions
Å	Angström
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ala, A	Alanine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Arg, R	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asn, N	Asparagine
Asp, D	Aspartate
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
Bgl	β -glucoside
BglG	Antitermineur PRD de l'opéron <i>bgl</i> (<i>Escherichia coli</i>)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
°C	Degré Celsius
CAT	Co-antitermineur
CCA	<i>Carbon catabolite activation</i>
CCCC	Carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone
CcpA	<i>Catabolite control protein A</i>
<i>ccpa</i>	Gène codant pour la protéine CcpA
CCR	<i>Carbon catabolite repression</i>
CHAPS	3-[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
Chb	Diacétylchitobiose
CheA	Protéine signal de la chimiotaxie (<i>Bacillus subtilis</i>)
cm	centimètre
CMP	Cytidine monophosphate
<i>cre</i>	<i>Catabolite response element</i>
Crh	<i>Catabolite repression HPr</i>
CUT1 / CUT2	<i>Carbohydrate uptake transporter-1 / -2 family</i>
ΔA_{340}	Delta (différence d') absorbance à 340 nm

Da	Dalton
DeoR	Répresseur de l'opéron <i>deo</i> (<i>E. coli</i>)
DHA	Dihydroxyacétone
DiGE	Électrophorèse différentielle
DMT	<i>Drug/metabolite transporter superfamily</i>
DO _{XXX}	Densité optique à XXX nm
DTT	Dithiothréitol
$\epsilon_{280\text{nm}}$, $\epsilon_{340\text{nm}}$	Coefficient d'extinction molaire à 280 nm ou 340 nm
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EI	Enzyme I
EII	Complexe de l'enzyme II
FBP	Fructose 1, 6-biphosphate
FCCP	4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone
FOS	Fructooligosaccharides
Fru	Fructose
g	Gramme
× g	"x" fois la force gravitationnelle
G+C	Guanine et cytosine
G6P	Glucose-6-phosphate
Gal	Galactose
GalR	Répresseur de l'opéron <i>gal</i> (<i>E. coli</i>)
Gat	Galacticol
Gla _{Lac}	Aquaglycérolporine (<i>Lactococcus lactis</i>)
Glc	Glucose
Glc'd	Glucoside
GlcT	Antitermineur PRD de l'opéron <i>pts</i> (<i>B. subtilis</i>)
Gln, Q	Glutamine
GlpF	<i>Glycerol facilitator</i>
GlpK	Glycérol kinase (<i>Enterococcus casseliflavus</i>)
GlpT	Antiporteur glycérol-3-phosphate (<i>E. coli</i>)
Glu, E	Glutamate
Gly, G	Glycine
GntP	<i>Gluconate :H⁺ symporter family</i>
GPHS	<i>Glycoside-Pentoside-Hexuronide:Cation Symporter Family</i>
GRP	<i>Glucose/ribose porter family</i>
Gut	Glucitol
h	Heure
H ⁺	Proton
His, H	Histidine
HPr	<i>Heat stable protein</i>
HprK/P	HPr kinase/phosphorylase
HTH	Hélice-tour-hélice
IgG	Immunoglobuline G
IIA, IIB, IIC, IID	Protéine et / ou domaine du complexe de l'enzyme II
IIA _{LacS}	Domaine IIA du transporteur LacS
Ile, I	Isoleucine

IPG	<i>Immobilized pH gradient</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
KDGT	<i>2-keto-3-deoxygluconate transporter family</i>
K_m	Constante de Michaelis
Lac	Lactose
LacI	Répresseur de l'opéron <i>lac</i> (<i>E. coli</i>)
<i>lacS</i>	Locus codant pour LacS
LacS	Transporteur du lactose
LacT	Antitermineur PRD de l'opéron lactose (<i>Lactobacillus casei</i>)
LacY	Symporteur du lactose (<i>E. coli</i>)
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate déhydrogénase
Leu, L	Leucine
Lev	Levanase
LevR	Activateur PRD de l'opéron <i>lev</i> (<i>B. subtilis</i>)
LicR	Activateur PRD de l'opéron <i>lic</i> (<i>B. subtilis</i>)
LicT	Antitermineur PRD de l'opéron <i>bgl</i> (<i>B. subtilis</i>)
Lys, K	Lysine
LysR	Activateur de l'opéron <i>lys</i> (<i>E. coli</i>)
M	Molaire
μ A	Microampère
μ Ci	Microcurie
μ g	Microgramme
μ l	Microlitre
μ M	Micromolaire
μ m	Micromètre
μ mol	Micromole
Mal	Maltose
Man	Mannose
Met, M	Méthionine
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
mg	milligramme
min	minute
MIP	<i>Major intrinsic protein family</i>
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
<i>msm</i>	<i>Multiple-sugar metabolism</i> (opéron)
Mtl	Mannitol
MtlR	Activateur PRD de l'opéron <i>mtl</i> (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
Na^+	Ion sodium
NADP / NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADH / NAD^+	Nicotinamide adénine dinucléotide
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
NifA	<i>Nitrogen-fixing protein A</i> (activateur transcriptionnel)
nl	Nanolitre

nM	Nanomolaire
nm	Nanomètre
NtrC	<i>Nitrogen-regulatory protein C</i> (activateur transcriptionnel)
OPA	<i>Organophosphate:P_i antiporter family</i>
OxIT	Transporteur de l'oxalate
~P	Groupement phosphoryle à haute énergie
-P	Groupement phosphoryle
³² P	Isotope radioactif du phosphore
p/v	poids / volume
PAGE	Gel de polyacrylamide en condition non dénaturante
pb	Paires de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPck	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEP[³² P]	Phosphoénolpyruvate marqué à l'aide de l'isotope radioactif ³² P
pH	Potentiel hydrogène
Phe, F	Phénylalanine
P _i	Phosphate inorganique
pI	Point isoélectrique
pM	Picomolaire
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
PP	<i>Polyol porter family</i>
PP _i	Pyrophosphate
PRD	<i>PTS regulatory domain</i>
Pro, P	Proline
PTS	Phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase
PTS-AG	Superfamille ascorbate-galacticol (transporteur de type PTS)
PTS-GFL	Superfamille glucose-fructose-lactose (transporteur de type PTS)
PTS-Gut	Famille glucitol (transporteur de type PTS)
<i>ptsH</i>	Gène codant pour la protéine HPr
<i>ptsI</i>	Gène codant pour l'enzyme I
RAT	<i>Ribonucleic antiterminator</i>
RbsR	Répresseur de l'opéron <i>rbsABCDK</i> (<i>B. subtilis</i>)
s	Seconde
Sac	Sucrase
SacT	Antitermineur PRD des gènes <i>sacPA</i>
SacY	Antitermineur PRD du gène <i>sacB</i>
Scr	Saccharose
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
Ser, S	Sérine
SHS	<i>Sialate:H⁺ symporter family</i>
SP	<i>Sugar porter family</i>
SSS	<i>Solute:sodium symporter family</i>
STM	Segments transmembranaires
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TCDB	<i>Transporter classification database</i>

TEAB	Bicarbonate de triéthylammonium
Th	Thompson
THB	<i>Todd-Hewitt Broth</i>
Thr, T	Thréonine
TRAP	<i>Tripartite ATP-independent periplasmic</i> (transporteur)
Tre	Tréhalose
TTBS	<i>Tween-Tris buffer saline</i>
TYE	<i>Tryptone-yeast extract</i>
Tyr, Y	Tyrosine
v/v	volume / volume
Val, V	Valine
W	Watt
YjdC (ManR)	Activateur PRD des gènes liés au métabolisme du mannose (<i>B. subtilis</i>)

Chapitre 1

Introduction

1.1 Généralité

En 1673, Antonie van Leeuwenhoek observa pour la première fois des micro-organismes grâce à un microscope de sa fabrication. Depuis cette première observation, des milliers d'espèces bactériennes ont été répertoriées. Ces dernières se distinguent entre autres par leur forme, leur taille, leur capacité à se mouvoir et à s'adapter à leur environnement respectif. Ainsi, elles ont, au cours des siècles, évolué afin d'être compétitives dans leur niche écologique. L'acquisition de sources d'énergie est d'ailleurs l'un des moteurs principal de cette spécialisation. En se basant sur les bactéries métabolisant les sucres comme sources principales de carbone, le nombre important et la grande variété des différents modes de transport existants rendent compte de l'importance de cet aspect dans leur physiologie (266, 306).

En se basant sur le système de classification TCDB (*Transporter Classification Database*), proposé par Saier *et al.* (317), quatre classes de transporteurs peuvent servir au transport

des sucres chez les bactéries. La distinction entre les quatre classes se fait sur la base du mode de transport et du mécanisme de couplage énergétique associé au transporteur (266). Il y a ainsi i) les protéines formant des canaux/pores transmembranaires assurant le transport par diffusion facilitée, ii) les transporteurs secondaires, permettant le transport aux dépens de la force proton-motrice, la force Na-motrice ou, encore, *via* un échange avec différents ions ou des molécules solubles de petites tailles, iii) les transporteurs primaires, où le transport se fait aux dépens d'une source d'énergie primaire comme l'ATP, et iv) les transporteurs assurant, de façon séquentielle, la translocation et la phosphorylation des sucres aux dépens du phosphoénolpyruvate (PEP), le système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase (PTS) (Fig. 1). Le cas du PTS est particulier. Unique aux bactéries, ce système, en plus d'assurer le transport des sucres, participe directement ou indirectement à la répression et l'activation catabolique, soit par régulation de l'expression d'un nombre important de gènes, soit par exclusion d'inducteurs. Un bref aperçu des différents modes de transport des sucres sera fait avant de discuter plus longuement du système à l'étude, le PTS. L'importance de ce système et la caractérisation des différents éléments associés à ce dernier seront donc discutées en détail à la section 1.3 de ce chapitre.

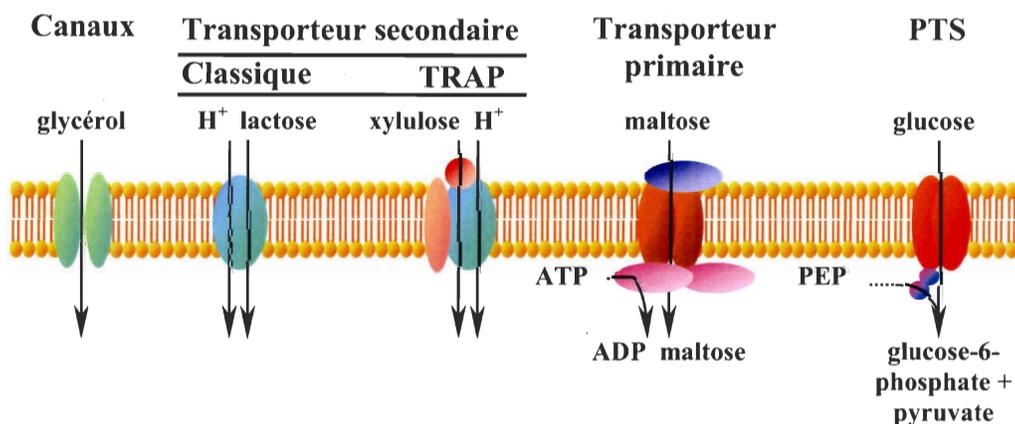


Figure 1 : Représentation schématique des quatre principales classes de transporteurs. Les canaux transmembranaires assurent le transport par diffusion facilitée. Les transporteurs secondaires emploient l'énergie chimiosmotique (exemple : les gradients de protons). Les transporteurs primaires emploient une forme d'énergie chimique (exemple : l'ATP). Enfin, le PTS assure la translocation et la phosphorylation des substrats aux dépens du PEP. Figure inspirée de Paulsen *et al.* et Kelly et Thomas (178, 266).

Les différents travaux décrits ici cibleront, dans la mesure du possible, des études menées auprès des représentants du *phylum* des *Firmicutes*. En effet, les genres bactériens étudiés dans cette thèse sont tous à Gram positif membres de la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Bacillales* ou des *Lactobacillales* (Fig. 2). Contrairement aux bactéries du *phylum* des *Actinobacteria*, les Firmicutes ont toutes un faible contenu en G+C.

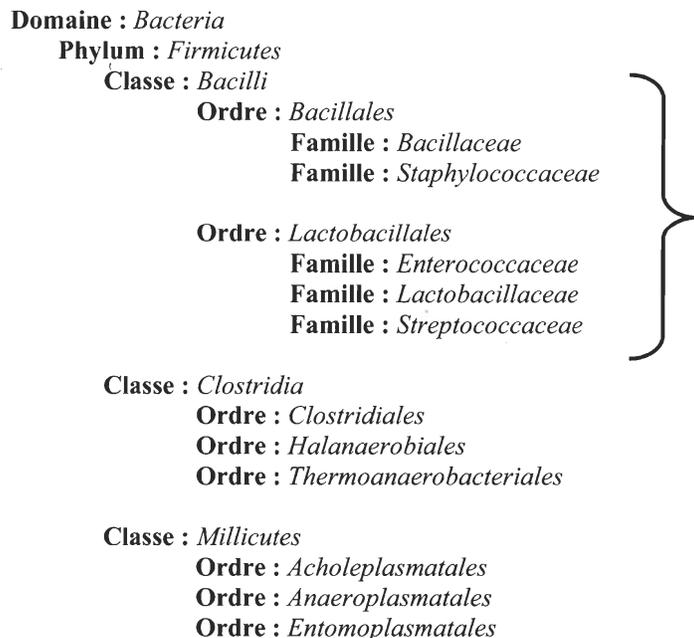


Figure 2 : Présentation des différentes familles de bactéries à Gram positif faisant partie du *phylum* des *Firmicutes*. L'accolade précise les ordres et familles étudiés. Les données de cette figure ont été obtenues de la banque de données de taxonomie du site de NCBI.

1.2 Systèmes de transport

Tel que mentionné précédemment, il existe quatre grandes classes de transporteurs ayant des représentants avec des affinités plus ou moins grandes pour leurs substrats. Bien que les travaux de cette thèse portent plus particulièrement sur le PTS, une brève revue des autres modes de transport, en mettant un accent particulier sur les Firmicutes, sera faite afin de bien situer le contexte global de ces travaux.

1.2.1 Canaux et pores transmembranaires

Le système de transport le plus simple chez les bactéries consiste en une diffusion facilitée d'une molécule à travers la membrane ne nécessitant aucune dépense d'énergie. Malgré

cette relative simplicité, le transport des sucres par ce type de transporteur est peu commun chez les bactéries (266).

Les membres de la famille MIP (*major intrinsic protein family*) forment tous des canaux transmembranaires plus ou moins spécifiques, permettant le transport de molécules d'eau, de sucres simples (ex : glycérol), de NH_3 , de CO_2 et de certains ions. Les protéines MIP ont été retrouvées autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (7, 40, 97, 229, 281). Les protéines de la famille MIP sont sub-divisées en deux groupes : les aquaporines assurent uniquement le transfert de l'eau alors que les aquaglycérolporines assurent le transfert de solutés divers et de l'eau à des ratios variés (157, 342). Ainsi, seules ces dernières participent aux transferts des sucres. À titre indicatif, notons que les aquaporines ont été observées chez différentes espèces de Firmicutes dont les bacilles, les streptocoques et *Enterococcus faecalis* ainsi que chez certains membres des Actinobactéries dont *Corynebacterium glutamicum* (347).

Les aquaglycérolporines permettent la diffusion facilitée de l'eau et de certains solutés dont le glycérol. Bien que l'analyse des génomes de bactéries à Gram positif révèle plusieurs protéines à canaux similaires à la GlpF (*glycerol facilitator*) de *Escherichia coli* (8, 11, 33, 322), très peu ont été étudiées à ce jour. Chez *E. coli*, l'analyse cristallographique de GlpF a permis de résoudre sa structure quaternaire à 2.2 Å (98). Ainsi, sous la forme native, elle présente une structure tétramérique disposant de quatre canaux transmembranaires distincts (Fig. 3). Ce transporteur, en plus d'assurer le passage du glycérol, permet l'entrée de l'érythritol, de pentitols et hexitols, de l'urée, de la glycine et du DL-glyceraldéhyde (139). Par contre, des études *in vivo*, effectuées en système hétérologue, démontrent que les canaux de la GlpF sont très sélectifs et qu'ils assurent le transfert du glycérol de façon prépondérante (230, 231). En effet, ces canaux forment des pores transmembranaires permettant un taux de transfert du glycérol estimé à 10^6 molécules \times s⁻¹ \times protéine⁻¹, soit un taux 100- à 1000-fois supérieur à ce qui est observé chez la plupart des transporteurs (139, 231). Enfin, la vitesse de transfert du glycérol vers la cellule demeure linéaire à des concentrations de substrat allant jusqu'à 200 mM. Cette observation sous-entend que les canaux formés par GlpF demeurent insaturés à ces concentrations élevées de substrats (139).

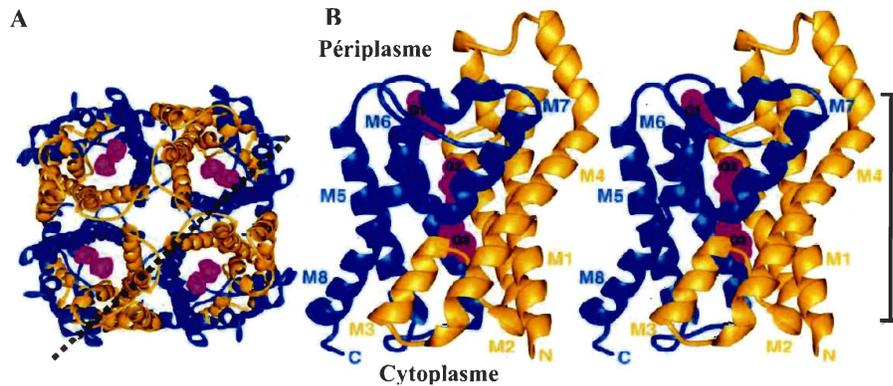


Figure 3 : Structure tridimensionnelle du canal transmembranaire GlpF de *E. coli*. La position des molécules de glycérol au niveau du pore transmembranaire est indiquée en magenta. A) Vue de la GlpF du côté périplasmique. La ligne pointillée présente la coupe employée pour la figure 2B. B) Vue transversale des pores transmembranaires formés par la GlpF ainsi que la position des molécules de glycérol lors de leur transfert de part et d'autre de la membrane. La barre verticale (35 Å) représente la position de la membrane. Figure tirée de Fu *et al.* (98) avec autorisation.

Chez les bactéries à Gram positif, Froger *et al.* (96) ont mis en évidence la présence d'une aquaglycérolporine chez *Lactococcus lactis*. Cette protéine, dénommée Gla_{Lac}, présente un cas particulier puisqu'elle jouerait à la fois le rôle des aquaporines et des GlpF trouvées chez *E. coli* (96). En effet, contrairement aux aquaglycérolporines étudiées chez les eucaryotes où les porines assurant le transport de l'eau présentent une faible affinité pour le glycérol (192, 363), Gla_{Lac} conserve une très forte spécificité pour le transport du glycérol.

1.2.2 Transporteurs secondaires

Dans le cas des transporteurs secondaires, un potentiel électrochimique est nécessaire afin de permettre le transfert d'une molécule de l'extérieure à l'intérieure de la cellule. Les transporteurs secondaires sont divisés en trois sous-classes où seuls les transporteurs de la première classe, les porteurs, peuvent participer au transport des sucres. Ainsi, plus d'une vingtaine de familles de transporteurs catalysant ce type de transport ont été associées aux transporteurs secondaires de type porteurs (306). Selon la définition émise par le système de classification des transporteurs (307), un transporteur fait parti de la sous-classe des porteurs s'il emploie au moins l'un des trois types de transport suivants : i) les uniports qui catalysent le transfert d'une molécule soit par diffusion facilitée ou, si la molécule est chargée, grâce au potentiel de membrane, ii) les symports qui catalysent le transport de

deux molécules ou plus dans la même direction en utilisant comme source d'énergie un potentiel de membrane, iii) les antiports qui assurent le transport en des directions opposées de deux molécules ou plus, en utilisant comme source d'énergie un potentiel de membrane (Fig. 4).

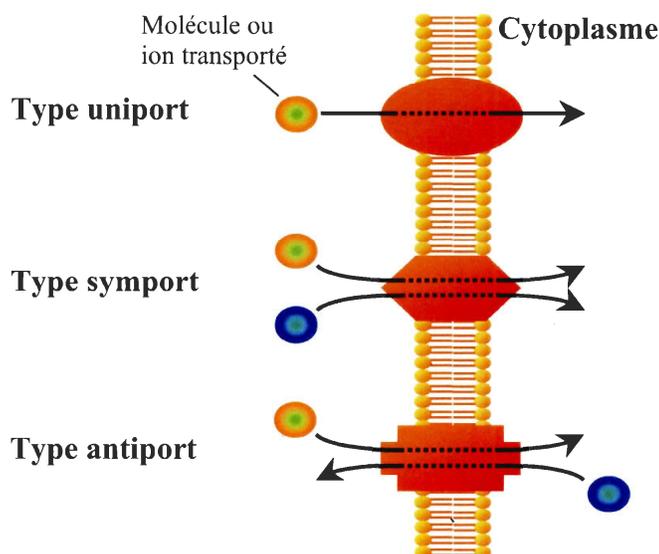


Figure 4 : Représentation schématique des différents modes de transport de type secondaire.

L'étendue du transport des sucres par les transporteurs secondaires est particulièrement bien illustrée par l'importance et la grande diversité de la MFS (*major facilitator superfamily*) qui, en 2000, comprenait déjà quelques centaines de membres (306). Nous proposons, dans les paragraphes qui suivent, un survol des membres de la MFS assurant le transport des sucres chez les bactéries. Une analyse plus exhaustive de LacS, un transporteur du lactose appartenant aussi à la MFS et présent chez diverses bactéries à Gram positif dont *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius* sera effectuée ultérieurement (voir section 1.3.3.1.2, page 27). Pour finir, nous présenterons un bref aperçu des autres familles de transporteurs catalysant le transport des sucres.

1.2.2.1 *Major Facilitator Superfamily* (MFS)

La MFS est la superfamille de transporteurs la plus vaste répertoriée à ce jour. Déjà, en 2000, elle comptait 28 familles (306) alors qu'aujourd'hui elle a presque doublé en importance (Tableau 1). Elle est composée de plus de 52 familles qui, malgré des écarts

importants sur le plan phylogénétique, partagent toutes un ancêtre commun (263, 305, 309). De plus, quatre familles ne faisant initialement pas partie de la MFS sont aujourd'hui associées à ce groupe (263, 306). En effet, le développement de méthodes d'analyses plus sophistiquées ont démontré que ces familles étaient des membres éloignées de la MFS. Très diversifiés, on retrouve des transporteurs secondaires de la MFS sous diverses formes oligomériques (111) capables de transporter de petites molécules en réponse à un gradient d'ion (263). De ce fait, ils catalysent des transferts de type uniport, symport (soluté:cation (H^+ ou Na^+)) et/ou antiport (soluté: H^+ ou soluté:soluté).

Tableau 1 : Liste complète des familles de la « *major facilitator superfamily*^a »

# TC	Familles des transporteurs membres de la MFS ^b	# de STM ^c	Organismes ^d
2.A.1.1	Sugar Porter family (SP)	10, 11, 12	B, A, E
2.A.1.2	<i>Drug:H⁺ Antiporter-1 Family (DHA1)</i>	11, 12	B, E
2.A.1.3	<i>Drug:H⁺ Antiporter-2 Family (DHA2)</i>	12, 13, 14, 16	B, A, E
2.A.1.4	Organophosphate:P_i Antiporter Family (OPA)	10, 11, 12	B, E
2.A.1.5	Oligosaccharide:H⁺ Symporter Family (OHS)	12	B
2.A.1.6	<i>Metabolite:H⁺ Symporter Family (MHS)</i>	12	B
2.A.1.7	Fucose:H⁺ Symporter Family (FHS)	12	B, E
2.A.1.8	<i>Nitrate/Nitrite Porter Family (NNP)</i>	9, 11, 12, 14, 24	B, E
2.A.1.9	<i>Phosphate:H⁺ Symporter Family (PHS)</i>	9, 12	E
2.A.1.10	<i>Nucleoside:H⁺ Symporter Family (NHS)</i>	12	B
2.A.1.11	<i>Oxolate:Formate Antiporter Family (OFA)</i>	11	B
2.A.1.12	Sialate:H⁺ Symporter Family (SHS)	11, 14	B, E
2.A.1.13	<i>Monocarboxylate Porter Family (MCP)</i>	12	E
2.A.1.14	<i>Anion:Cation Symporter Family (ACS)</i>	11, 12, 13	B, E
2.A.1.15	<i>Aromatic acid:H⁺ Symporter Family (AAHS)</i>	12	B
2.A.1.16	<i>Siderophore-Iron Transporter Family (SIT)</i>	15	E
2.A.1.17	<i>Cyanate Porter Family (CP)</i>	11	B
2.A.1.18	Polyol Porter Family (PP)	12	B
2.A.1.19	<i>Organic Cation Transporter Family (OCT)</i>	8, 11, 12	E
2.A.1.20	Sugar Efflux Transporter Family (SET)	12	B
2.A.1.21	<i>Drug:H⁺ Antiporter-3 Family (DHA3)</i>	12	B
2.A.1.22	<i>Vesicular Neurotransmitter transporter Family (VNT)</i>	12	E
2.A.1.23	<i>Conjugated Bile Salt Transporter Family (BST)</i>	12	B
2.A.1.24	<i>Unknown Major Facilitator-1 Family (UMF1)</i>	11	E
2.A.1.25	<i>Peptide-Acetyl-Coenzyme A Transporter Family (PAT)</i>	12, 14	B, E
2.A.1.26	<i>Unknown Major Facilitator-2 Family (UMF2)</i>	12	B
2.A.1.27	<i>Phenyl Proprionate Permease Family (PPP)</i>	12	B
2.A.1.28	<i>Feline Leukimia Virus Subgroup C Receptor Family (FLVCR)</i>	12	E
2.A.1.29	<i>Unknown Major Facilitator-4 Family (UMF4)</i>	11, 12	A
2.A.1.30	<i>Putative Abietane Diterpenoid Transporter Family (ADT)</i>	12	B
2.A.1.31	<i>Nickel Resistance Family (Nre)</i>	11, 12	B
2.A.1.32	<i>Putative Aromatic Compound/Drug Exporter Family (ACDE)</i>	12	B
2.A.1.33	<i>Putative YqgE Transporter Family (YqgE)</i>	12	B, A
2.A.1.35	<i>Fosmidomycin Resistance Family (Fsr)</i>	12	B
2.A.1.36	<i>Acriflavin-sensitivity Family (YnfM)</i>	12	B
2.A.1.38	<i>Enterobactin (Siderophore) Exporter Family (EntS)</i>	12	B
2.A.1.39	<i>Vibrio ferrin (Siderophore) Exporter Family (PrsC)</i>	12	B
2.A.1.40	<i>Purine Transporter, AzgA Family (AzgA)</i>	12	B, E
2.A.1.41	<i>Putative Bacteriochlorophyll Delivery Family (BCD)</i>	12	B
2.A.1.42	<i>Lysophospholipid Transporter Family (LpIT)</i>	12, 14	B
2.A.1.43	<i>Putative Magnetosome Permease Family (PMP)</i>	12, 18	B
2.A.1.44	<i>L-Amino Acid Transporter-3 Family (LAT3)</i>	12	E
2.A.1.45	<i>2,4-diacetylphloroglucinol Exporter Family (PHL-E)</i>	ND	B

2.A.1.46	<i>Unknown Major Facilitator-5 Family</i> (UMF5)	ND	B
2.A.1.47	<i>Unknown Major Facilitator-6 Family</i> (UMF6)	ND	B
2.A.1.48	<i>Vacuolar Basic Amino Acid Transporter Family</i> (V-BAAT)	ND	E
2.A.1.49	<i>Endosomal Spinster Family</i> (Spinster)	ND	E
2.A.1.50	<i>Heme Carrier Protein Family</i> (HCP)	ND	E
2.A.1.51	<i>Unknown Major Facilitator 7 Family</i> (UMF7)	ND	B
2.A.1.52	<i>Unknown Major Facilitator 8 Family</i> (UMF8)	ND	B
2.A.1.53	<i>Phagosomal Amino Acid Transporter Family</i> (Pht)	ND	B
2.A.1.54	<i>Unknown Major Facilitator-9 Family</i> (UMF9)	ND	B, A
2.A.2	<i>Glycoside-Pentoside-Hexuronide:Cation Symporter Family</i> (GPHS)	11, 12, 13	B, A, E
2.A.17	<i>Proton-Dependent Oligopeptide Transporter Family</i> (POT)	11, 12, 14	B, E
2.A.60	<i>Organo Anion Transporter Family</i> (OAT)	11, 12, 14	B, E
2.A.71	<i>Folate-Bioperin Transporter Family</i> (FBT)	12, 13, 14	B, E

^a Information tirée du site de la TCDB (www.tcdb.org)

^b Les familles en caractère gras sont en mesure d'assurer le transport des sucres.

^c Le nombre de segment transmembranaire (STM) en caractère gras est majoritaire dans une famille donnée. ND, non disponible.

^d B, bactérie ; A, archa ; E, eucaryote.

Il existe huit familles distinctes comprenant des transporteurs impliqués dans le transport des sucres chez les bactéries (Tableau 1). De celles-ci, la famille SP est très certainement la plus importante. Elle comprend plus de 200 membres et ceux-ci catalysent le transport d'une gamme importante de sucres dont le glucose, le lactose, le fructose et les α -glucosides (309). De plus, ces transporteurs présentent une grande variabilité quant au mode de transport utilisé où les modes uniport et symport:cations semblent privilégiés. Qui plus est, sous certaines conditions, des représentants de la SP peuvent devenir des antiports soluté:soluté dont le taux de transfert des sucres rivalise ou est plus rapide que les modes de transfert unidirectionnel (306). Bien que des membres de ces huit familles assurent le transfert de sucres, des transporteurs de certaines familles ont des particularités propres. Ainsi, les transporteurs de la famille OPA assurent le transfert de sucre-phosphate, ceux de la famille PP transfèrent des sucres alcool, alors que les membres de la famille SHS transfèrent le sialate, un sucre anionique. Chez les bactéries, la plupart des transporteurs ont été caractérisés chez *E. coli*. Malgré tout, une analyse par comparaison de séquences a établi que chacune des familles de transporteurs assurant le transfert des sucres possède des représentants chez divers genres bactériens à Gram positif à faible G+C dont *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* (53, 78, 124, 191, 201, 209, 265, 343, 374).

Les transporteurs de la MFS présentent, dans l'ensemble, une topologie similaire. À quelques exceptions près, ils ont généralement 12 à 14 hélices α transmembranaires.

Henderson et Maiden (140) posèrent l'hypothèse selon laquelle les transporteurs de la MFS résulteraient d'un événement de duplication d'un gène qui, à l'origine, codait pour une protéine de six ou sept hélices α transmembranaires. Ils posèrent cette hypothèse suite à l'observation chez différents transporteurs à 12 segments transmembranaires (STM) d'un motif très conservé chez les membres de la MFS, « RXGRR » (219), présent à la fois sur les hélices 2 et 3 et les hélices 8 et 9. Cette caractéristique a depuis été observée chez la plupart des membres de la MFS (263, 301).

La résolution de la structure à 6,5 Å d'un premier transporteur bactérien, le transporteur pour l'oxalate (OxIT) (147), ainsi que l'obtention subséquente des structures tridimensionnelles à 3,3 Å et 3,5 Å de l'antiporteur GlpT et du symporteur LacY, a permis de développer un modèle tridimensionnel des membres de cette superfamille (Fig. 5). Malgré quelques divergences quant à la symétrie, les trois structures connues des transporteurs demeurent similaires comme le démontre d'ailleurs la superposition des structures de la GlpT et LacY (Fig. 6) (1). Enfin, bien que l'étude de OxIT ait laissé croire à un double événement de duplications intragéniques plutôt qu'un seul (146), l'analyse subséquente des structures de GlpT et LacY n'a pas permis de confirmer que ce phénomène était répandu chez les membres de la MFS (2, 156).

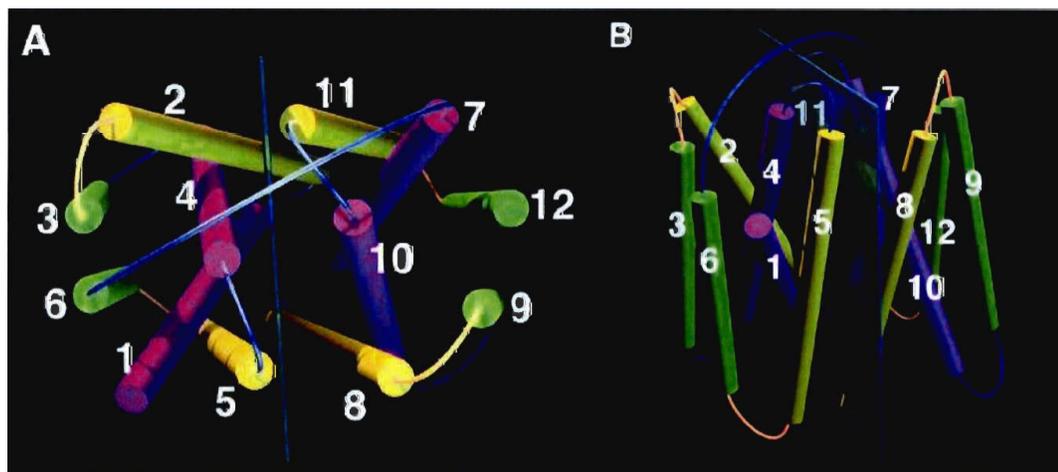


Figure 5 : Structure tridimensionnelle du transporteur OxIT. A) Vue cytoplasmique du transporteur. B) Vue transversale du transporteur. L'axe de symétrie est représenté sur chacun des panneaux. Figure tirée de Hiraï *et al.* (146).

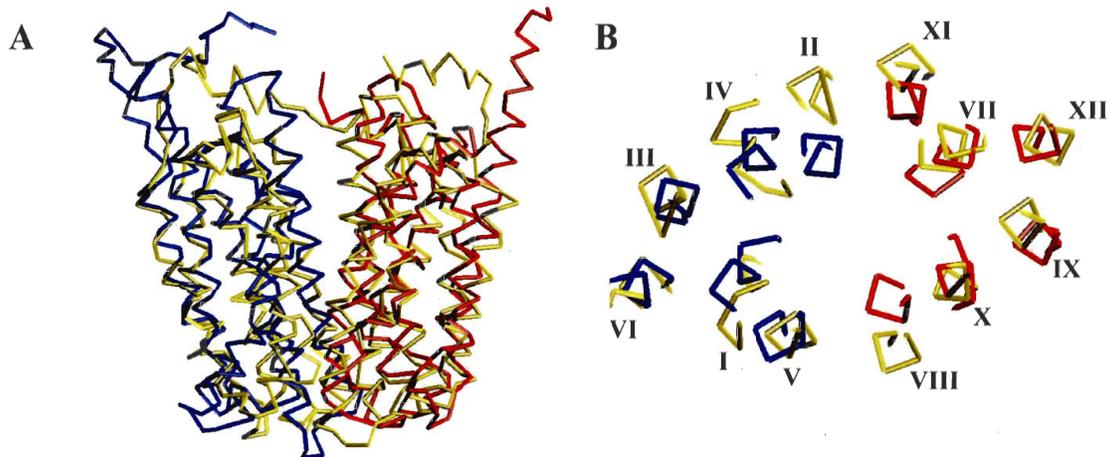


Figure 6 : Superposition des structures de LacY et GlpT. A) Vue parallèle à la membrane. B) Vue de la superposition du côté cytoplasmique de la membrane. La structure en jaune correspond à LacY alors que les structures en bleu et rouge correspondent respectivement aux domaines N- et C-terminal de GlpT. Figure tirée de Abramson *et al.* (1) avec autorisation.

Les structures de LacY et GlpT supportent le modèle proposé de transport à accès alternatif où le site de liaison du substrat n'est accessible que d'un côté de la membrane à la fois (Fig. 7). Selon ce modèle, le site de liaison du substrat serait initialement accessible du côté extracellulaire. La liaison d'un substrat induirait un changement de conformation du transporteur qui exposerait son site de liaison au cytoplasme où le substrat serait libéré (1, 401). Le mode d'action selon lequel la liaison du substrat au site actif mène à un changement de conformation du transporteur n'est pas encore connu. Par contre, les travaux de Abramson *et al.* (1) suggèrent que la modification de quelques résidus clés au niveau du site actif permettrait de changer la spécificité de ce dernier.

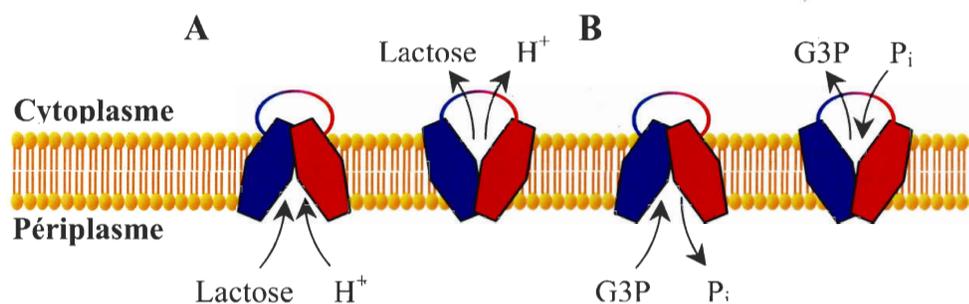


Figure 7 : Représentation schématique du modèle de transport par accès alternatif. A) LacY emploie un mécanisme de symport Lactose: H^+ pour assurer le transport du sucre dans la cellule. B) GlpT emploierait un système antiport Glycérol-3-phosphate (G3P): P_i . Ce modèle se traduit par la présence d'une conformation des transporteurs faisant face à l'extérieur (gauche) et d'une conformation des transporteurs faisant face à l'intérieur de la cellule (droite). Figure tirée de Abramson *et al.* (1).

1.2.2.2 Autres familles de transporteurs secondaires

Cinq familles additionnelles de transporteurs secondaires ne faisant pas partie de la MFS assurent le transfert des sucres : la superfamille DMT (*drug/metabolite transporter superfamily*) et les familles GntP (*gluconate: H^+ symporter family*), KDGT (*2-keto-3-deoxygluconate transporter family*) et SSS (*solute:sodium symporter family*). Compte tenu de leur importance réduite quant au transport des sucres chez les bactéries, ces dernières ne feront pas l'objet de descriptions détaillées. La superfamille DMT, elle-même composée de plusieurs familles, renferme deux familles de transporteurs des sucres. Par contre, seule la famille GRP (*glucose/ribose porter family*) comprend des transporteurs présents chez les bactéries à Gram positif. Cette famille comprend entre autres un transporteur du glucose chez *Staphylococcus xylosus* et un transporteur putatif du ribose chez *Lactobacillus sakei* (87, 335). Chez la famille GntP, un transporteur assurant le transport de type symport D-gluconate: H^+ a été identifié chez *Bacillus subtilis* (285). Un transporteur permettant le transport du 2-céto-3-déoxygluconate a été retrouvé chez *B. subtilis* mais, tout comme pour le transporteur de la famille GntP, aucune caractérisation fonctionnelle n'a été faite sur ce dernier. L'opéron *kdgRKAT*, codant aussi pour ce type de transporteur, présente une séquence *cre* (*catabolite response element*) suggérant que certains membres de cette famille seraient sous le contrôle de la répression catabolique (voir section 1.3.3.2.2, page 41) (282). Enfin, la SSS présente des transporteurs à polarité inversée (dirigée vers l'intérieur) employant un mécanisme de symport couplé au sodium (306). Cette famille ne se limite pas

au transport des sucres et assure le transfert de plusieurs substrats différents dont les acides aminés, vitamines, nucléosides, inositol, ions organiques et inorganiques et l'urée. Bien que des symports glucose/galactose:sodium aient été retrouvés chez des bactéries (365), aucun transporteur de ce type n'a été étudié chez les Firmicutes.

Un dernier groupe pourrait assurer le transport des sucres chez les bactéries : les transporteurs de type TRAP (*tripartite ATP-independent periplasmic*). Ces transporteurs, contrairement aux autres transporteurs secondaires, sont composés de trois domaines ou protéines (178); un domaine extracellulaire assurant la fixation des molécules et deux domaines ou protéines membranaires de tailles différentes assurant le transport des molécules à l'intérieur de la cellule grâce à un système de type symport molécule:H⁺ (Fig. 1). La présence et la diversité des transporteurs TRAP seraient importantes chez les bactéries bien que peu d'entre eux semblent être en mesure de transporter des sucres. Ainsi, ils assureraient le transport du mannitol chez certaines bactéries à Gram négatif dont *Rhodobacter sphaeroides* et *Vibrio cholerae* et du L-lyxose chez *E. coli* et *Haemophilus influenzae* (178).

1.2.3 Transporteurs primaires

Les transporteurs primaires, une catégorie de transporteurs utilisant une source d'énergie primaire afin d'assurer le transport de molécules contre un gradient de concentration, effectuent autant l'import que l'export d'une multitude de substrats. Tous les transporteurs de sucres fonctionnant selon un mode de transport primaire font partie des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et appartiennent aux familles CUT1 et CUT2 (*carbohydrate uptake transporter-1 / -2 family*) (306). Tout comme leur nom l'indique, les transporteurs ABC fonctionnent grâce à l'énergie générée par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP mais sans phosphorylation de protéines (144, 249, 330, 352).

La majorité des transporteurs de type ABC présente une structure similaire (Fig. 8) (211). Ainsi, ces transporteurs sont formés de deux domaines ou sous-unités transmembranaires, ainsi que de deux domaines ou sous-unités cytoplasmiques (domaine ABC) (321). D'ailleurs, les représentants de cette famille possèdent tous différents modules ABC hautement conservés. Ils ont à la fois les motifs communs aux protéines utilisant l'ATP,

soit les motifs Walker A et Walker B (387), et une séquence signature consensus « LSGGQ » localisée entre les motifs Walker A et B, caractéristique aux transporteurs appartenant à cette famille (145, 239). La comparaison des structures cristallines de différents domaines ABC montre que la plupart partagent une conformation tridimensionnelle similaire suggérant que le mécanisme couplant le transport à l'hydrolyse de l'ATP chez les transporteurs ABC serait analogue (213). D'après des travaux menés sur le transporteur du maltose / maltodextrine de *E. coli*, considéré comme un modèle représentatif des transporteurs ABC, l'utilisation de l'ATP aurait comme rôle de permettre au transporteur de reprendre une conformation au repos et, de ce fait, d'être en mesure d'effectuer un autre cycle de transfert (213).

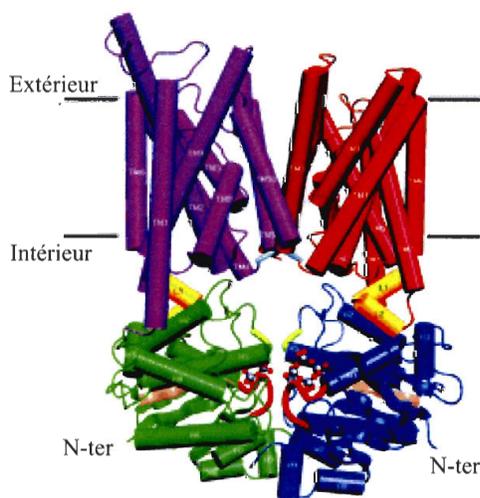


Figure 8 : Structure du transporteur de la vitamine B₁₂ de *E. coli*. Ce dernier est composé de quatre sous-unités, soit les deux sous-unités membranaires BtuC (mauve et rouge) et les deux cassettes ABC (vert et bleu). Vue parallèle à la membrane. Figure tirée de Locher *et al.* (211).

La présence de ces transporteurs, bien que moins importante que celle des transporteurs secondaires, a été confirmée chez les Firmicutes. En effet, les analyses des génomes de plusieurs bactéries à faible contenu en G+C rapportent la présence d'un seul transporteur de cette famille chez *Lactobacillus delbruekii* ssp *bulgaricus* (375), deux chez *S. thermophilus*, *Staphylococcus aureus* et *B. subtilis* (38, 148, 149, 191), trois représentants chez *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (8, 11, 264, 397), quatre et cinq chez *Streptococcus agalactiae* (114, 350) et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (39) respectivement et enfin sept transporteurs de type ABC

chez *Streptococcus pneumoniae* (351). Il est possible que ces valeurs soient sous-estimées. En effet, chez ces micro-organismes, plusieurs transporteurs appartenant à cette famille demeurent non caractérisés; il n'est donc pas exclus que certains d'entre eux participent au transport de sucres. Des différents transporteurs répertoriés, ceux assurant le transport du maltose et des maltodextrine, des fructooligosaccharides (FOS) et du ribose sont les plus fréquemment retrouvés chez les bactéries citées.

Concrètement, les travaux sur *Lactobacillus paracasei* portant sur le transport de FOS marqués au tritium, et ce, sous diverses conditions, suggèrent que le transport est effectué *via* un transporteur de la famille ABC (175). De la même façon, l'analyse de l'opéron *msm* chez *L. acidophilus* montre la présence de gènes codant pour les composants d'un transporteur ABC assurant le transport de FOS (28). Enfin, la présence des opérons *msm* rapportée chez *S. mutans* et, par homologie de séquence, chez *S. pneumoniae*, *B. subtilis* et *Bacillus halodurans* suggère que le transport des FOS chez les Firmicutes est effectué préférentiellement par des transporteurs de type ABC (28, 235, 302). Autre point à noter, il est probable que, chez certaines de ces espèces, la régulation de la transcription des gènes de l'opéron *msm* soit sous le contrôle de l'activation ou la répression catabolique. En effet, la présence de séquences *cre* en amont des opérons *msm* de *L. acidophilus* et *S. pneumoniae* pourrait indiquer une interaction avec le régulateur CcpA (*Catabolite control protein A*) (voir section 1.3.3.2.2, page 41).

1.3 Système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase

Le système PTS, mis en évidence voici plus de quarante ans par Kundig *et al.* (190), assure la phosphorylation et la translocation de divers sucres aux dépens du phosphoénolpyruvate. Présent uniquement chez les bactéries, il est principalement retrouvé chez les bactéries anaérobies strictes ou facultatives bien que sa présence ait aussi été confirmée chez quelques bactéries aérobies dont *Pseudomonas aeruginosa* (291). Le PTS (Fig. 9) peut être divisé en deux parties : les protéines dites générales et celles dites spécifiques. Les protéines générales du système PTS comprennent les protéines cytoplasmiques participant à la phosphorylation de tous les sucres PTS : l'enzyme I (EI) et la protéine HPr (*heat stable protein*). Les complexes d'enzymes II (EII) correspondent aux protéines spécifiques du

PTS. Ces derniers définissent la spécificité du système, chacun assurant la phosphorylation et la translocation d'un ou d'un nombre restreint de sucres de structure apparentée (312). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'utilisation du PTS comme moyen de transport et de phosphorylation des sucres est plus efficace que l'emploi d'un transporteur primaire (185). En effet, le coût énergétique pour le transport et la phosphorylation d'une molécule de sucre qui entre par le PTS se limite à une molécule de PEP – i.e. : une molécule d'ATP – alors que l'emploi d'un transporteur primaire nécessite l'utilisation de deux molécules d'ATP : la première servira pour le transport alors que la seconde sera utilisée pour la phosphorylation du sucre.

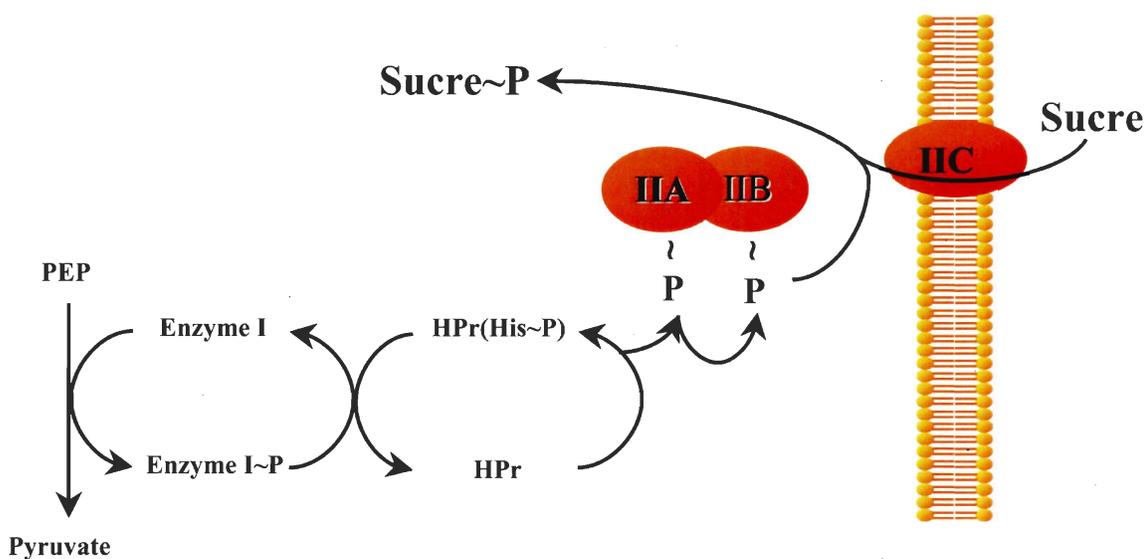


Figure 9 : Représentation schématique du système phosphoénolpyruvate:sucre phosphotransférase.

Le mécanisme général permettant l'entrée des sucres consiste en une cascade de phosphorylation débutant par l'autophosphorylation de l'enzyme I aux dépens du PEP. Le groupement phosphorylé présent sur EI est alors transféré à la protéine HPr, puis aux domaines IIA et IIB des complexes d'enzymes II. Finalement, le groupement phosphorylé est transféré aux sucres suite à son transport dans la cellule *via* les domaines membranaires IIC ou IIC/IID.

Outre son rôle de transporteur, le PTS assure, par l'entremise de ses composants, certaines fonctions secondaires chez diverses bactéries (27, 278, 308, 311, 313). Concrètement, il

participe à la régulation du transport de sucres PTS et non-PTS, à la régulation du métabolisme de l'azote et à la régulation de la réponse chimiotaxique (187, 278, 395). De plus, le PTS est impliqué dans les phénomènes de répression et d'activation catabolique par la régulation de transcription de plusieurs gènes *via* des mécanismes d'interaction protéine-protéine ou de phosphorylation de régulateurs transcriptionnels (46, 337, 338, 358, 380, 389).

Les analyses effectuées sur 174 génomes bactériens (136 espèces appartenant à 89 genres) ont dévoilé la présence partielle ou entière du système PTS chez plus de 100 espèces bactériennes (27). De ce nombre, 77 espèces, soit 57% de l'ensemble des espèces étudiées, possèdent tous les composants nécessaires au bon fonctionnement du PTS. Les Firmicutes sont d'ailleurs bien représentés dans cette étude où 32 espèces différentes appartenant à 12 genres distincts ont un PTS complet, soit 94% des Firmicutes étudiés. De ces espèces, on dénombre, entre autres, plusieurs bacilles, streptocoques, lactobacilles ainsi que des espèces des genres *Clostridium* et *Mycoplasma*. L'importance du PTS est telle chez certaines espèces que celles-ci possèdent des dizaines de gènes codant pour des protéines impliquées de près ou de loin au fonctionnement de ce système de transport (27, 313). Par exemple, *Listeria monocytogenes* et *E. faecalis* possèdent respectivement 91 et 93 gènes codant pour différentes protéines du PTS. De ce fait, la prévalence que prend le PTS auprès d'une espèce ne semble pas être proportionnelle à la taille de son génome mais serait plutôt en relation avec les voies métaboliques employées lors du catabolisme des sucres. En effet, les bactéries dont la production d'énergie repose sur le métabolisme anaérobie des sucres *via* la glycolyse présentent généralement un plus grand nombre de complexes EII différents (266).

1.3.1 L'enzyme I

L'enzyme I, la protéine qui catalyse la première réaction du PTS, est composée de deux domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal, compact, comprend le site actif alors que le domaine C-terminal semble plus flexible et moins structuré (51, 133, 204). La première étape du PTS consiste en l'autophosphorylation de EI aux dépens du PEP. Cette étape requiert la forme homodimérique de l'enzyme, chaque monomère possédant une masse

variant entre 58 et 85 kDa selon l'espèce (189, 236, 242), et la présence de cations divalents; la nécessité de ces derniers se limite à l'autophosphorylation de l'enzyme I (398). En effet, des études menées à l'aide de domaines tronqués de l'enzyme I montrent que le domaine N-terminal est incapable d'être autophosphorylé par le PEP (204, 326) mais qu'il peut toujours être phosphorylé de façon réversible par HPr. Ceci s'explique par le fait que ce domaine est incapable de se dimériser (52, 259) puisque cette fonction revient au domaine C-terminal et nécessite la présence de cations divalents (45, 416). Ainsi, la dimérisation, nécessaire à l'autophosphorylation de EI, serait régulée par des interactions de type protéine-protéine entre les domaines C-terminaux de l'homodimère (113).

Le site de fixation du PEP à l'EI fut, dans un premier temps, localisé dans la région du domaine C-terminal se trouvant entre les résidus 334 à 489 (405). De cette région, les travaux de Gagnon *et al.* (100) ciblent la zone située entre les résidus 431 à 462 où 16 des 32 acides aminés sont strictement conservés chez *E. coli*, *S. salivarius* et *Rhodobacter capsulatus*. De plus, la sensibilité au pH acide ainsi que la résistance du groupement phosphorylé au traitement thermique suggèrent que, à raison de un groupement phosphorylé par sous-unité de EI (278, 390), la liaison du phosphate inorganique s'effectue en position N-3 de l'anneau imidazole d'un résidu histidine situé en position 189 ou 191 chez *E. coli* et *S. salivarius*, respectivement (10, 41, 398). Cette région montre d'ailleurs une séquence conservée chez les EI et certaines protéines pouvant être phosphorylées (100, 236, 278).

Les études de cinétique réalisées avec l'EI montrent que cette enzyme catalyse la phosphorylation de HPr selon un mécanisme de type ping-pong (154, 316, 373). Ainsi, l'enzyme I réagit avec un premier substrat, le PEP ($K_m = 0,2$ à $0,6$ mM) (373, 394, 399) et donne lieu à la formation de EI~P, un intermédiaire obligatoire (398). Cet intermédiaire présente une très forte affinité pour un deuxième substrat, la protéine HPr ($K_m = 4$ à 40 μ M) (48, 373, 394, 399). Enfin, la phosphorylation de HPr par l'EI permet à EI de retrouver sa forme initiale et de recommencer le processus (Fig. 10).



Figure 10 : Représentation schématique d'une cinétique enzymatique de type ping-pong. « E » représente l'enzyme, « S » les substrats et « P » les produits.

Chez *B. subtilis*, EI~P interagit avec la protéine signal CheA et inhibe l'autophosphorylation de cette dernière (105). CheA étant impliquée dans la chimiotaxie de *B. subtilis*, ces résultats suggèrent ainsi un rôle du PTS dans la chimiotaxie chez les bactéries à Gram positif tout comme chez les bactéries à Gram négatif.

1.3.2 Les complexes d'enzymes II

Contrairement à EI et à HPr, les complexes protéiques des enzymes II assurent la spécificité du système. Les complexes EII sont généralement constitués de trois domaines bien qu'il arrive qu'un quatrième domaine soit présent (27, 269, 313). Les différents domaines, nommés IIA, IIB, IIC et IID, peuvent être associés selon plusieurs combinaisons. Ainsi, certains complexes EII sont composés de quatre protéines alors que chez d'autres, les différents domaines se retrouvent tous sur une seule protéine. L'analyse de tous les PTS effectuée par Barabote et Saier (27) montre que, chez les familles d'EII composées de trois domaines, toutes les combinaisons sont observées à l'exception des fusions IIAC, IIBAC, IICA et IICAB. Ces résultats démontrent que les complexes EII ne sont pas « homogènes » quant à leur structure quaternaire. De plus, contrairement à ce qui est observé chez les transporteurs de la MFS où tous proviennent de la même protéine ancestrale, les EII auraient des origines variées. En conséquence, ces complexes protéiques sont divisés en quatre superfamilles / familles à l'intérieur desquelles chaque membre partage une origine commune qui les distinguent des autres familles. De ce fait, les complexes EII appartenant à une même famille partagent aux moins 25% d'identité de séquence, alors que la similarité entre membres de différentes familles se limite à quelques motifs conservés (200, 278, 314, 318).

La superfamille glucose-fructose-lactose (PTS-GFL) est composée, comme son nom l'indique, de trois familles. Des quatre familles initiales, la superfamille PTS-GFL est la plus représentée chez les bactéries. En effet, 30% de l'ensemble des transporteurs PTS

identifiés font partie de la famille glucose, 25% de celle du fructose et 14% de celle du lactose, soit 69% de tous les transporteurs de type PTS connus (27). Les domaines IIC de ces transporteurs sont composés de six à huit STM et la protéine ancestrale de ces transporteurs est inconnue (312). Selon les travaux de Saier *et al.* (304, 312), la protéine ancestrale de cette superfamille assurait le transport du fructose. Cette hypothèse repose notamment sur le fait que le fructose est un des seuls sucres à pouvoir intégrer la glycolyse sans avoir à subir de réarrangement structural. D'ailleurs, en soutien à ce postulat, plusieurs bactéries possèdent uniquement des EII assurant le transport du fructose. Ainsi, sur la prémisse que la glycolyse est la voie métabolique des sucres la plus ancienne, Saier *et al.* (312) ont proposé que le fructose a été le premier sucre à avoir été transporté *via* le PTS, la spécificité duquel se serait par la suite élargie à d'autres sucres de structures apparentées. Sur cette base, un modèle représentant l'évolution des divers membres de cette superfamille a été proposé (Fig. 11). Enfin, bien qu'il y ait homologie au niveau des domaines IIC, ce n'est pas le cas des domaines IIA et IIB appartenant à cette superfamille (49, 312). Il en résulte que le couplage du transfert du groupement phosphate inorganique aux sucres catalysé par les transporteurs de la superfamilles PTS-GFL est effectué par des protéines de structures différentes mais qui accomplissent la même tâche.

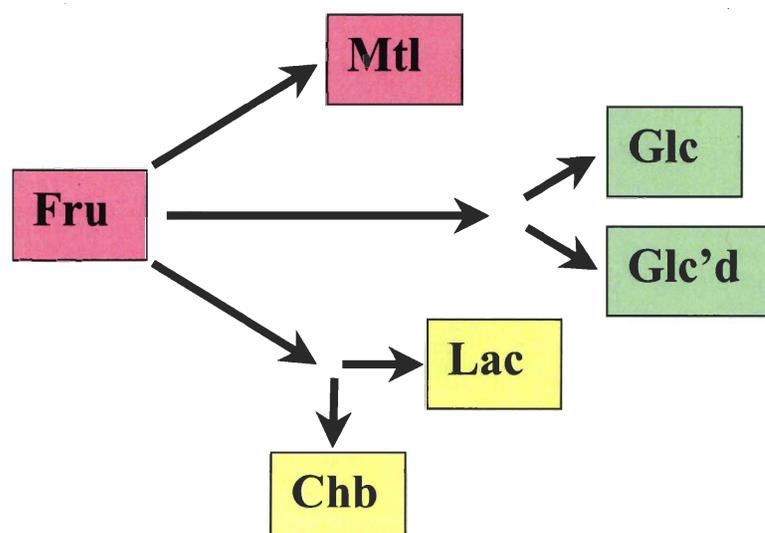


Figure 11 : Représentation schématique du modèle de l'évolution des différents transporteurs (domaines IIC) de la superfamille GFL. Relativement rapprochés d'un point de vue phylogénétique, les transporteurs du fructose (Fru) et du mannitol (Mtl) font partie de la famille du fructose (rose). Plus éloignés, les transporteurs du glucose (Glc) et des glucosides (Glc'd) font partie de la famille du glucose (vert). Enfin, les transporteurs du lactose (Lac) et du diacétylchitobiose (Chb), de la famille du lactose (jaune), divergent le plus du transporteur initial. Figure tirée de Saier *et al.* (312).

La famille mannose est la deuxième en importance avec une représentation de l'ordre de 15% des transporteurs de type PTS identifiés à ce jour. Ces transporteurs sont retrouvés, à une exception près, chez les Firmicutes et les γ -protéobactéries (27, 417). Les membres de cette famille catalysent le transport de plusieurs hexoses dont le mannose, le glucose, le fructose, le sorbose, la glucosamine, la galactosamine, le N-acétyl galactosamine et certains sucres non métabolisables comme le 2-désoxyglucose, un analogue du mannose (41). Cette famille diffère des trois autres sur plusieurs points. En outre, la distribution des membres de cette famille suggère que ces derniers auraient participé aux développements de l'adaptation des bactéries à la vie en symbiose avec les animaux (417). L'expansion et la différenciation de ces membres auraient alors évoluées parallèlement à ce procédé grâce, entre autres, à des transferts horizontaux de gènes. Les transporteurs des complexes d'enzymes II^{Man} possèdent tous un domaine membranaire supplémentaire, le domaine IID, et, bien que ce dernier interagisse directement avec le domaine IIC, il est généralement retrouvé sur un polypeptide à part. En effet, moins de 5% des domaines IID se présentent sous la forme IICD. Différentes expériences de fusion chez *E. coli* ont d'ailleurs permis de développer un modèle de la structure en deux dimensions de IIC^{Man} et IID^{Man} (200). Selon

ce modèle, la portion C-terminale du transporteur IIC et N-terminale de la protéine IID interagiraient l'une avec l'autre du côté extracellulaire. Enfin, le domaine IIB des complexes EII^{Man} est phosphorylé sur une histidine. Ceci diffère aussi des autres familles où la phosphorylation des domaines IIB se fait sur une cystéine (200, 269).

La superfamille ascorbate-galacticol (PTS-AG), composée de deux familles distinctes, est la troisième en importance. Elle représente 13% des transporteurs de type PTS identifiés à ce jour, soit 9% et 4% pour les familles ascorbate et galacticol (Gat) respectivement (27). Les domaines IIC de cette famille sont composés de 12 STM et résulteraient de l'évolution d'un transporteur secondaire à 12 STM de la MFS (161, 312). Les domaines IIA et IIB des transporteurs de la superfamille PTS-AG sont liés phylogénétiquement aux domaines IIA et IIB de la superfamille PTS-GFL. Cette corrélation suggère que le couplage du transfert du groupement phosphorylé au transport des sucres chez les membres de cette superfamille aurait été assuré par des enzymes IIA et IIB présents bien avant l'apparition des transporteurs IIC de la PTS-AG (312). Finalement, certains éléments laissent croire que les transporteurs IIC de la famille Gat permettent le transport des sucres *via* le PTS mais aussi selon un mode de transport secondaire.

La dernière famille de transporteurs du PTS est aussi la plus petite. Les transporteurs de la famille glucitol (PTS-Gut) sont présents chez les bactéries à Gram positif et négatif (27, 288, 348). Dans l'ensemble, ils représentent 3% des domaines IIC identifiés (27). L'analyse des quelques transporteurs de cette famille ayant fait l'objet d'études plus poussées montrent qu'aucune similarité n'existe avec les domaines IIC des autres familles (408). L'un des caractères particuliers à cette famille réside dans le fait que le domaine IIC est scindé en deux (288). En effet, les parties N-terminale et C-terminale du domaine IIC sont reliées de part et d'autre au domaine IIB soit à l'aide de séquences pontantes ou d'interaction non covalente selon que les domaines de EII^{Gut} soient présents sur une même chaîne polypeptidique ou non (Fig. 12). Enfin, l'analyse des séquences des domaines IIA et IIB suggère que ces derniers sont phosphorylés sur des résidus histidines et cystéines respectivement. Bien que le résidu cystéine soit présent au niveau d'une zone conservée de 13 résidus chez les domaines IIB des EII^{Gut} , il n'existe aucune donnée expérimentale venant confirmer cette hypothèse (348).

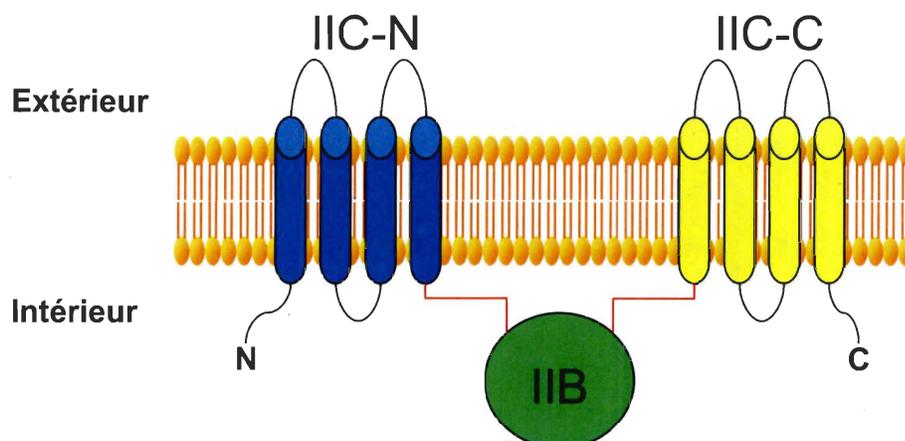


Figure 12 : Structure des EII de la famille glucitol. Les sections en rouges représentent soit des séquences pontantes ou des régions à interaction non covalente. Inspirée de Reizer *et al.* (288).

Une cinquième famille existe au sein des EII. La famille dihydroxyacétone (DHA) a été volontairement omise car elle ne catalyse pas le transport de sucres de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les protéines de cette famille sont homologues à une DHA kinase ATP-dépendante (267, 332). Ces transporteurs ont été identifiés chez plusieurs bactéries à faible G+C (27) mais seul le système de *E. coli* a été caractérisé (103). Ce système est composé de trois protéines correspondant aux domaines IIA à IIC ainsi que d'une protéine composée de trois domaines : la section N-terminale du domaine IIA^{DHA}, un domaine HPr et la partie C-terminale d'une enzyme I tronquée (130). Les domaines IIA et IIB sont phosphorylés aux dépens du PEP. Par contre, le domaine IIB^{DHA} n'est pas phosphorylé. En fait, ce domaine se lie fortement à l'ADP, un cofacteur qui agit alors à titre de site actif et qui recevra le groupement phosphorylé du domaine IIA^{DHA} (312). Ainsi, les membres de cette famille présentent des caractéristiques propres aux DHA kinases et au PTS. Cet état suggère que les membres de la famille DHA sont, sur le plan évolutif, dans un état de transition entre les deux systèmes.

Le processus de phosphorylation est généralement le même pour tous les complexes EII. Le groupement phosphorylé provenant de HPr(His~P) est transféré à la position N³ d'un résidu histidine présent sur le domaine IIA. Ensuite, ce dernier phosphoryle le domaine IIB. Tel que mentionné précédemment, cette phosphorylation s'effectue généralement sur une cystéine (200, 314) mais, dans le cas des EII de la famille mannose, cette phosphorylation

s'effectue en position N¹ d'un résidu histidine (200, 269). La dernière étape consiste en la translocation d'un sucre PTS dans la cellule *via* le domaine IIC et au transfert du groupement phosphorylé présent sur le domaine IIB à ce sucre (200). D'ailleurs, l'étude de divers mutants IIC montre que les fonctions de transfert et de phosphorylation des sucres peuvent être dissociées (123, 297). En plus de ce rôle dans le PTS, certains domaines IIC auraient des fonctions supplémentaires. De ce fait, notons que les EII de la famille galactitol pourraient agir à titre de transporteur secondaire et que EII^{Mtl} de *E. coli* permettrait la diffusion facilitée des sucres à travers la membrane cytoplasmique (81, 312). Cette dernière fonction n'assure probablement pas un rôle significatif dans le transport des sucres puisque le taux de transfert est cent fois inférieur à celui observé lorsque le transfert du mannitol est couplé à la phosphorylation. Enfin, Robillard et Broos (297) ont proposé un site de liaison des sucres sur les domaines IIC. Ils ont observé que le motif hautement conservé « [Gn]-[Iv]-[Tsn]-E » est partagé par les différents membres des familles d'enzymes II et que ces résidus sont positionnés à la surface externe de la membrane. L'importance du résidu glutamate a déjà fait l'objet d'étude chez l'EII^{Mtl} de *E. coli* où il a été démontré que son absence nuisait à la liaison et au transfert du mannitol (320). Toujours chez *E. coli*, Lai *et al.* (194) ont proposé la séquence consensus élargie « [Flm]-[Gn]-[Iv]-[Tsn]-E-P-[Aiv]-[ILms]-[Fy]-G-[Vilma]-[Npt]-[Li] » comme site de fixation des disaccharides chez les transporteurs de la superfamille PTS-GFL.

Chez quelques bactéries à Gram négatif, le complexe EII joue un autre rôle. En effet, tout comme HPr(Ser~P) est impliquée dans la régulation du métabolisme des sucres PTS et non PTS chez les bactéries à Gram positif (voir section 1.3.3.2, page 38), certains complexes EII assurent une fonction semblable chez les bactéries à Gram négatif (313, 372). Par exemple, le domaine EIIA^{Glc} chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* est en mesure de moduler de façon allostérique des transporteurs de sucres non-PTS ainsi que l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc. Ainsi, le domaine EIIA^{Glc} peut inhiber l'entrée de certains inducteurs tout en contrôlant l'expression de plusieurs opérons dépendants de l'AMPc (313, 372). De plus, les domaines IIA^{Glc} des bactéries entériques peuvent transférer leur groupement phosphorylé à divers domaines IIB dont IIBC^{Scr} de *E. coli* et *B. subtilis* ainsi que IICB^{Tre} et IICB^{Mal} de *E. coli* (200).

1.3.3 HPr

La protéine HPr est la composante centrale du PTS. De petite taille (8 à 12 kDa), elle assure plusieurs fonctions en plus du transfert des groupements phosphorylés des EI~P aux complexes d'enzymes II, ceux-ci étant impliqués directement dans le transport de monosaccharides et disaccharides (278). Ainsi, HPr est phosphorylée en N^{δ1} de l'anneau imidazole d'un résidu histidine conservé situé en position 15 par le biais de EI. Sous cette forme, HPr(His~P) assure aussi la régulation de la transcription de certains gènes de même que le contrôle de l'activité d'enzymes et de transporteurs (56, 71, 202, 380). De la même façon, chez les bactéries à Gram positif, HPr peut être phosphorylée sur un deuxième résidu, la sérine située en position 46. La Ser₄₆ se situe au sein d'une région dont la séquence en acides aminés hautement conservée « NLK⁴⁶SIMXVM » servirait de site de reconnaissance à la protéine HPr kinase/phosphorylase (HprK/P) qui phosphoryle HPr sur le résidu sérine (415). Cette phosphorylation se fait aux dépens de l'ATP grâce à l'activité de HprK/P, une enzyme bifonctionnelle ayant des activités de kinase et de phosphorylase (44, 94, 274, 389). Alors que HPr(His~P) effectue ses fonctions par transfert d'un groupement phosphorylé, HPr(Ser-P), qui ne peut transférer son groupement phosphorylé à cause de la stabilité du lien phosphodiester (76), effectue ses fonctions *via* des interactions de type protéine/protéine (129, 274, 389, 413). Enfin, chez certaines bactéries à Gram positif, HPr peut se retrouver sous la forme doublement phosphorylée. Bien que peu d'études portent sur le rôle de HPr(Ser-P)(His~P), il a néanmoins été démontré que, sous cette forme, HPr est toujours en mesure de transférer le groupement phosphorylé présent sur le résidu histidine à des domaines IIA (56, 202).

1.3.3.1 HPr(His~P)

La phosphorylation de HPr en position N^{δ1} du résidu His₁₅ est catalysée par EI~P. Cette réaction conduit à la formation de HPr(His~P) et survient autant chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. Ce lien, de type phosphoramidate, possède une haute énergie mais est relativement instable et subit, *in vitro*, une phosphohydrolyse continue de l'ordre de 0,07 min⁻¹ chez *S. salivarius* (48). Ce taux est d'ailleurs du même ordre de grandeur à ce qui a été observé chez d'autres espèces (12, 15, 391). HPr(His~P) participe à

la chaîne de réaction du système PTS en phosphorylant à son tour les domaines protéiques EIIA (Fig. 9 et Fig. 13) (278). Elle est aussi impliquée dans la régulation de transporteurs de sucres non-PTS, dont LacS, un transporteur du lactose retrouvée entre autres chez *S. thermophilus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* et *Leuconostoc lactis* (56, 92, 201, 277, 383). Ainsi, chez ces organismes, LacS est phosphorylée par HPr(His~P) sur un résidu His situé sur le domaine IIA retrouvé en C-terminal de ce transporteur (128). HPr(His~P) participe aussi au contrôle de certaines enzymes dont les glycérol kinases de *B. subtilis*, *E. faecalis* et *Enterococcus casseliflavus* (50, 69, 290). Enfin, HPr(His~P) phosphoryle certains régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD (*PTS regulatory domain*) (337).

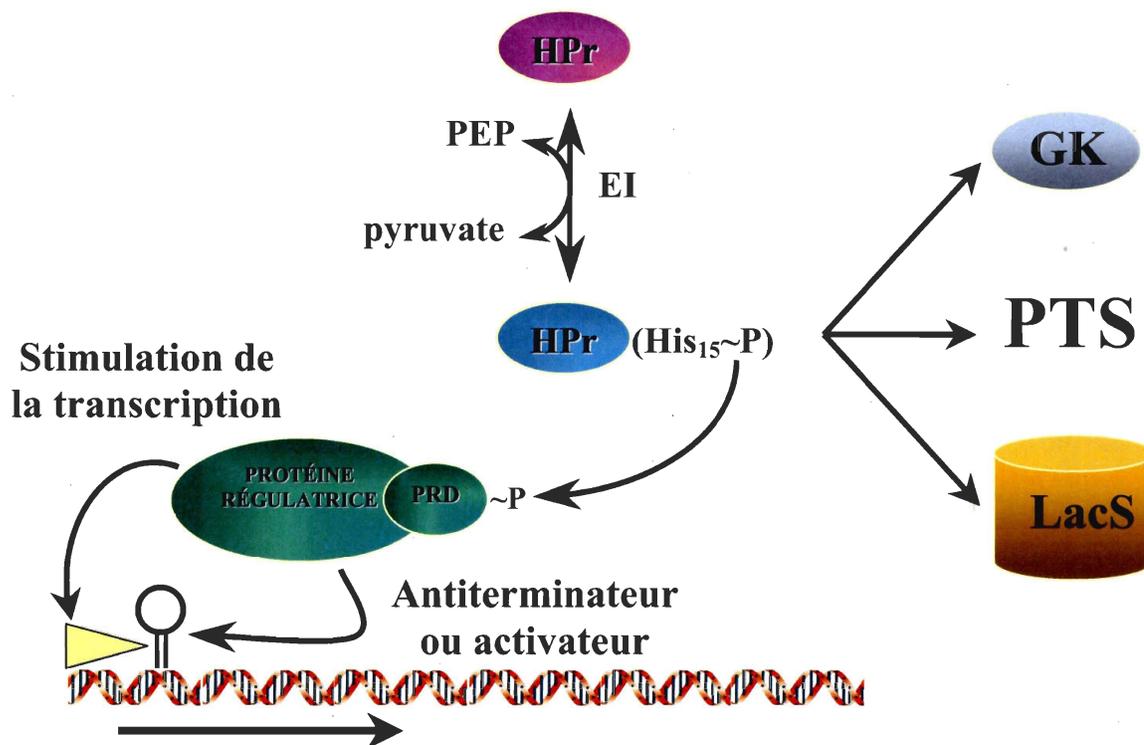


Figure 13 : Rôle de HPr(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C. « GK » représente la glycérol kinase, « LacS » fait référence au transporteur du lactose alors que « PRD » correspond à *PTS regulatory domain*.

1.3.3.1.1 Contrôle de l'activité enzymatique *via* HPr(His~P)

Le glycérol, un sucre non PTS, est généralement transporté à l'intérieur des cellules bactériennes grâce à des canaux transmembranaires (voir section 1.2.1, page 3). Ce sucre est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase, une enzyme catalysant la phosphorylation du glycérol aux dépens de l'ATP (77, 206). Le glycérol-3-phosphate n'étant pas un substrat des canaux assurant le transport du glycérol, ce dernier est alors incapable de quitter la cellule (340). Cette phosphorylation rapide du glycérol permet à la cellule de conserver un gradient de glycérol de part et d'autre de la membrane où la concentration intracellulaire de glycérol demeure très faible, favorisant son internalisation par diffusion facilitée (50). La glycérol kinase joue donc un rôle central dans ce processus et, en modulant son activité, il est possible de contrôler l'entrée du glycérol dans la cellule.

En général, chez les bactéries, les premières indications de la participation du PTS dans le contrôle de la glycérol kinase furent observées chez des cellules dépourvues des enzymes générales du PTS, EI et HPr. Ces cellules étaient incapables de métaboliser le glycérol (115, 290, 300, 308, 315). Le mécanisme par lequel les composants du PTS participent au contrôle de la glycérol kinase est différent selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif. Par exemple, chez *E. coli* et *S. typhimurium*, deux bactéries à Gram négatif, l'EIIA^{Glc} se fixe allostériquement à la kinase ce qui mène à une baisse significative de son activité (64, 377). Au contraire, sous la forme phosphorylée, EIIA^{Glc}~P est incapable de se fixer à la glycérol kinase. Chez les bactéries à Gram positif, la régulation par le PTS s'effectue *via* la phosphorylation en position N³ d'un résidu histidine de la glycérol kinase par HPr(His~P) (50, 77). Cette phosphorylation réversible augmente l'activité enzymatique de la glycérol kinase. Par exemple, chez *E. faecalis* et *E. casseliflavus*, on observe une augmentation de l'activité d'un facteur d'environ 10 (50, 75). En contrepartie, les kinases de *Thermus flavus* et *Geobacillus stearothermophilus* (anciennement *Bacillus stearothermophilus* (254)), bien que phosphorylées par HPr(His~P), ne présentent qu'une activité enzymatique légèrement supérieure en présence de ce groupement phosphorylé (63). Cette différence pourrait par contre résider dans le fait que, en absence de glycérol-3-phosphate déshydrogénase thermostable, les expériences de quantification de l'activité

enzymatique ont dû être faite à 37°C alors que *G. stearothermophilus* et *T. flavus* croissent toutes deux à 60°C. Finalement, la présence de fructose biphosphate (FBP) inhibe l'activité des kinases et ce, peu importe leur origine (50, 210). Concrètement, chez *E. casseliflavus*, la présence de 10 mM de FBP diminue de sept fois l'activité de la glycérol kinase. Cette baisse est attribuée à un mécanisme d'inhibition impliquant une interaction allostérique du FBP à la glycérol kinase. Un mécanisme similaire est décrit pour expliquer le contrôle de cette molécule sur l'activité de la glycérol kinase de *E. coli* (64).

La comparaison de la séquence en acides aminés de plusieurs glycérol kinases, autant chez les bactéries à Gram positif que négatif, montre un pourcentage d'identité pouvant varier de 40% à 60% (50). Qui plus est, l'analyse comparative de ces séquences a permis l'identification d'une région hautement conservée « (Y/F)H₂₃₂F(Y/F)G » retrouvée uniquement chez les bactéries à Gram positif (50). Afin d'établir que le résidu histidine en position 232 était celui participant aux échanges avec HPr(His~P), la glycérol kinase de *E. casseliflavus* fut mutée de façon à remplacer cet histidine par soit l'alanine, le glutamate ou l'arginine. L'absence de phosphoglycérol chez ces mutants a confirmé l'importance du résidu His₂₃₂ (50). Compte tenu de la forte similitude entre les différentes glycérol kinases, il est fort probable que ce site ait les mêmes fonctions chez d'autres bactéries dont *B. subtilis* et *Streptococcus pyogenes*.

1.3.3.1.2 Le transporteur du lactose LacS et le contrôle de son activité *via* HPr(His~P)

Membre de la famille GPHS, LacS est un transporteur du lactose faisant partie de la MFS (276, 306). Il catalyse le transport des galactosides, dont les plus importants sont le lactose et le galactose, selon un mode symport sucre:H⁺ (93). Le lactose, une fois à l'intérieur de la cellule, est hydrolysé par la β-galactosidase ce qui résulte en la formation de glucose et de β-galactose. Chez *S. thermophilus* et, par analogie, chez *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, deux espèces dont la plupart des souches sont incapables de métaboliser correctement le galactose (159, 201, 383), LacS agit aussi comme antiport lactose:galactose (93, 160). Qui plus est, chez *S. thermophilus*, le transport de type antiport est plus efficace et employé préférentiellement au transport de type symport (129, 182, 385). Il en résulte donc que le galactose est excrété dans le milieu. Curieusement, chez *S. salivarius*, une espèce

phylogénétiquement rapprochée, le galactose n'est pas rejeté à l'extérieur mais métabolisé *via* la voie de Leloir (84, 177, 202, 374).

Tout comme chez la plupart des membres de la MFS, LacS présente une structure à 12 STM (93, 334). En revanche, il se retrouve sous la forme homodimérique (95, 111, 333). Les travaux de Veenhoff *et al.* (384) ont d'ailleurs démontré que cette structure quaternaire était nécessaire afin d'assurer le symport sucre:H⁺ contrairement au transfert de type antiport lactose:galactose où la forme monomérique suffit. L'analyse du locus *lacS* chez 29 souches de *S. thermophilus* révèlent la présence de trois groupes distincts mais dont le taux de similarité du locus au niveau de la séquence en nucléotides n'est jamais sous les 94% (82). De plus, contrairement à ce qui avait été rapporté précédemment (376), la plupart des différences observées se situe au niveau de la région promotrice, ce qui ne se traduit donc pas par une différence au niveau de la séquence en acides aminés de la protéine. Par ailleurs, l'analyse assistée par ordinateur de la séquence en acides aminés de plus de 30 LacS provenant de souches distinctes par Cochu *et al.* (56), incluant celles employées lors de l'analyse de la séquence d'ADN, montrent la présence de deux groupes présentant 95% de similarité.

Les transporteurs LacS de *L. lactis*, *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *S. salivarius* possèdent tous, en C-terminal, un domaine IIA (92, 201, 277, 383). Ce domaine renferme un résidu histidine qui peut être phosphorylé de façon réversible par HPr(His~P) et, du moins chez les deux streptocoques, par HPr(Ser-P)(His~P) (56, 202). Bien que le domaine IIA^{LacS} ne soit pas essentiel au transport des sucres par LacS, il joue un rôle de régulation chez *S. thermophilus* (275). En effet, la phosphorylation du résidu ⁵⁵²His stimulerait l'échange antiport galactose/lactose au détriment du transport de type symport lactose:H⁺ (126, 127, 385). Qui plus est, la phosphorylation de IIA^{LacS} par la forme doublement phosphorylée de HPr, retrouvée en grande quantité en phase exponentielle de croissance chez cette espèce, laisse sous-entendre que LacS serait phosphorylé dès le début de la croissance et non uniquement au cours de la période précédant la phase stationnaire (56). Un modèle récent propose que le domaine IIA^{LacS}~P agirait directement sur le transporteur afin de favoriser l'échange de type antiport (Fig. 14) (110). Chez *S. salivarius*, une espèce métabolisant le galactose, LacS peut aussi être

phosphorylé par les deux formes de HPr. Par contre, aucun rôle n'est pour le moment associé à cette phosphorylation (202).

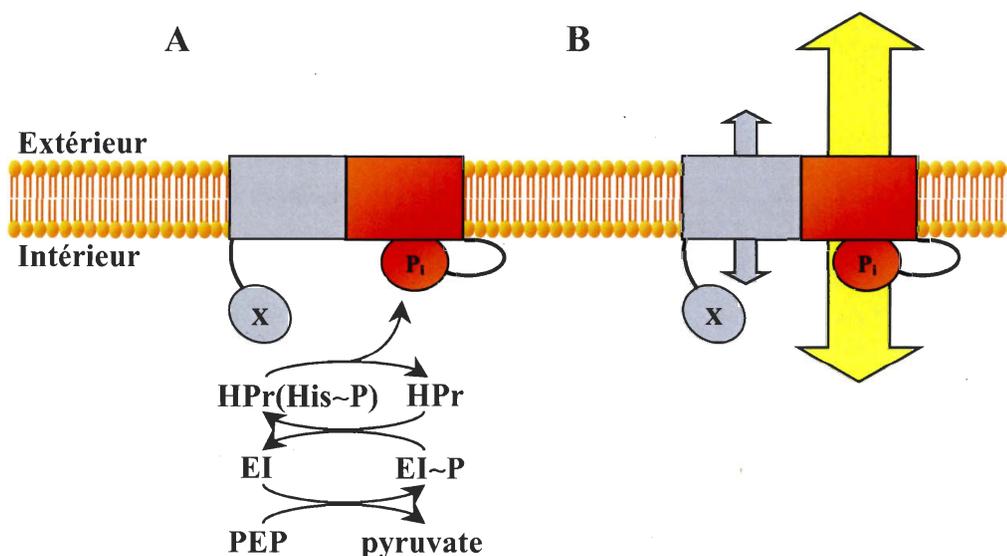


Figure 14 : Modèle de l'interaction entre le transporteur et le domaine IIA de LacS chez *S. thermophilus*. Le transporteur, intégré dans la membrane, est présenté par un rectangle alors que le domaine soluble IIA est présenté par un ovale. L'état de phosphorylation de IIA^{LacS} est représenté par X ou P_i représentant respectivement l'absence ou la présence d'un groupement phosphorylé. Les flèches opposées indiquent le transport antiport alors que la taille de ces dernières est le reflet du taux de transport. A) La phosphorylation de IIA^{LacS} mène à l'interaction de ce dernier avec le transporteur. B) Cette interaction accélère la vitesse de transport par antiport. La deuxième sous-unité (en grise) n'est pas affectée par la présence d'un domaine $IIA\sim P$ voisin. Figure tirée de Geertsma *et al.* (110).

1.3.3.1.3 Régulation de l'expression des gènes *via* HPr(His~P)

Le contrôle de l'expression des gènes chez les bactéries est une nécessité afin d'éviter le gaspillage énergétique et assurer une croissance optimale. Ainsi, divers mécanismes existent afin d'exercer ce contrôle. Par exemple, la présence d'un inducteur dans l'environnement peut déclencher une série de réponses qui mènera la bactérie à produire toute la machinerie nécessaire au transport et au métabolisme de cet inducteur. Ce mécanisme débute par la régulation de la transcription des gènes codant pour ces divers composants et est assuré par des régulateurs transcriptionnels qui peuvent être classés en trois catégories : des activateurs, des répresseurs et des antiterminateurs. Ainsi, dans le cas des activateurs, le contrôle se fait au niveau de l'initiation de la transcription qui est alors accrue (337). Les répresseurs vont inhiber partiellement ou totalement l'initiation de la

transcription *via* divers mécanismes. Par exemple, en absence de lactose chez *E. coli*, le represseur de l'opéron *lac*, LacI, se fixe à une séquence opératrice O1 présente à 11 pb en amont du promoteur. LacI peut alors se fixer à un opérateur auxiliaire, soit l'opérateur O2 situé à 401 pb, ou à l'opérateur O3, situé à 92 pb de l'opérateur O1. La fixation de LacI à ces deux opérateurs résulte en la formation d'une boucle sur l'ADN limitant l'accès du promoteur à l'ARN polymérase ce qui mène à une répression accrue de l'opéron *lac* (203). Enfin, les antiterminateurs assurent un taux supérieur de l'élongation du transcrit d'ARN. Dans tous les cas, ces régulateurs agissent en fonction de la présence ou de l'absence d'un inducteur dans le milieu (203, 337).

Compte tenu du nombre important de sucres disponibles dans la nature, les gènes et opérons impliqués dans leur métabolisme n'ont pas échappé à ce type de contrôle. Ainsi, on retrouve une série de protéines régulatrices contrôlées par la phosphorylation liée au PTS autant chez les bactéries à Gram positif que négatif (380). Ces régulateurs transcriptionnels sont facilement reconnaissables par la présence de deux domaines PRD. Au moment de l'écriture de cette thèse, 470 régulateurs de type PRD étaient répertoriés dans les bases de données de l'EBI (*European Bioinformatics Institute*). De ceux-ci, 401 ont été identifiés chez des Firmicutes, alors que seulement 53 l'ont été chez les γ -protéobactéries (http://www.ebi.ac.uk/interpro/ISpy?ipr=IPR011608&tax_id=2). Les régulateurs transcriptionnels de type PRD sont soit des antiterminateurs (Fig. 15A), soit des activateurs présentant des similitudes avec les régulateurs de la famille DeoR (Fig. 15B) ou NifA/NtrC (Fig. 15C).

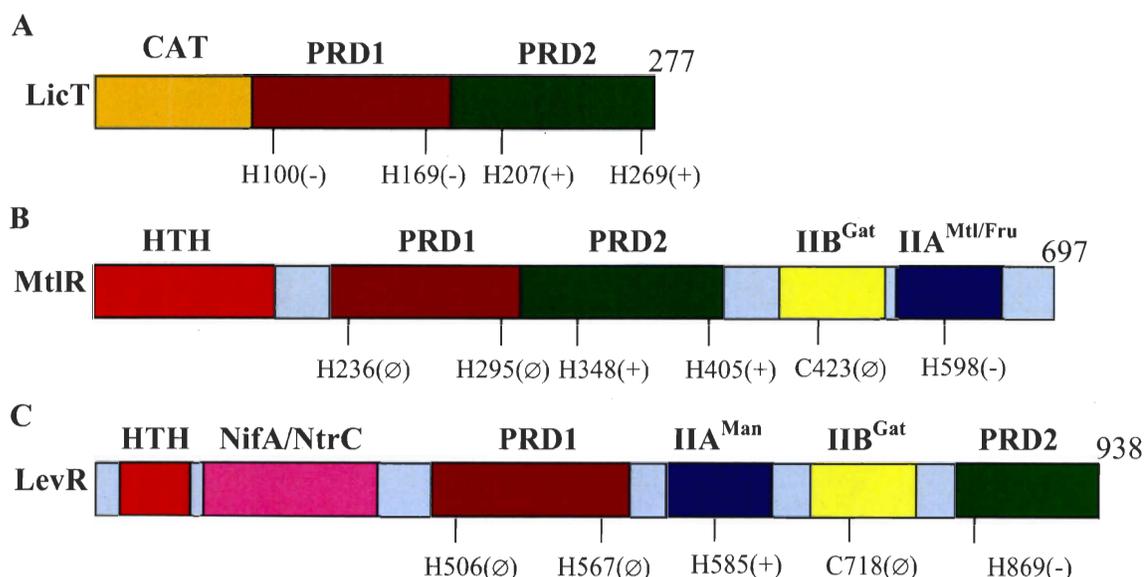


Figure 15 : Régulateurs de type PRD. A) Antiterminateur LicT de *B. subtilis*, B) Activateur MtlR, de type DeoR, de *G. stearothermophilus* et C) Activateur LevR, de type NifA/NtrC, de *B. subtilis*. L'effet de la phosphorylation des différents résidus His ou Cys est indiqué soit par un (+), soit par un (-) lors de l'activation ou de l'inhibition de l'activité du régulateur. Le symbole ∅ indique l'absence d'effet significatif ou de phosphorylation du résidu. « CAT » désigne co-antiterminateur alors que « HTH » désigne hélice-tour-hélice. Le chiffre présent à la fin de chaque protéine représente le nombre de résidus total de ces dernières. Figure inspirée de Van Tilbeurgh et Declerck (380) et de Deutscher *et al.* (70).

Les antiterminateurs contenant des domaines PRD (Fig. 15A) ont été caractérisés chez plusieurs organismes dont *E. coli* et des espèces des genres *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Les antiterminateurs appartiennent tous à la famille BglG/SacY (303, 360) et participent à la régulation du catabolisme de divers sucres dont les β-glucosides, le glucose, le lactose et le saccharose (70, 120, 303, 323, 337, 380). Le contrôle exercé par le PTS sur ces régulateurs permet de séparer ces derniers en deux classes (208, 361). Dans un premier temps, la majorité des antiterminateurs connus sont contrôlés négativement par les domaines IIB du PTS (61, 70, 121). Ainsi, en absence d'un sucre inducteur, les domaines IIB~P transféreront leur groupement phosphoryle aux domaines PRD1 des antiterminateurs qui leur sont associés et c'est la phosphorylation du premier résidu His des PRD1 et, dans une moindre mesure, du deuxième résidu His (117, 361) qui mènera à l'inactivation des antiterminateurs (70). Cette inactivation résulte en une diminution de la transcription des gènes ou opérons sous le contrôle de l'antiterminateur. Chez certains antiterminateurs, c'est HPr(His~P) qui phosphoryle les résidus His du

domaine PRD1 (70, 323, 360, 361) et cette phosphorylation est stimulée par les IIB~P correspondants. La différence entre les deux classes d'antiterminateurs se vérifie en présence du sucre inducteur. En effet, en présence de cet inducteur, les domaines IIB~P transfèrent prioritairement leur groupement phosphoryle aux sucres, libérant du coup les résidus histidines des domaines PRD1. Chez les antiterminateurs appartenant à la première classe, comme SacY et GlcT de *B. subtilis*, cette déphosphorylation des résidus His mène à une activation des antiterminateurs qui résulte en une transcription accrue des gènes ou opérons sous leur contrôle (61, 339). Dans le cas des antiterminateurs de la seconde classe, comme SacT et LicT de *B. subtilis* ainsi que BglG de *E. coli*, cette déphosphorylation n'active pas ou peu ces derniers (18, 119, 207). De ce fait, les antiterminateurs PRD de la seconde classe doivent, afin d'être pleinement actifs, être phosphorylés au niveau de leur domaine PRD2 (70). La phosphorylation des résidus His du domaine PRD2 chez ces antiterminateurs est médiée par HPr(His~P). En conséquence, ces régulateurs subissent un double contrôle par le PTS, soit un contrôle négatif *via* les IIB~P et la phosphorylation des résidus du domaine PRD1, soit un contrôle positif *via* HPr(His~P) et la phosphorylation des résidus du domaine PRD2. Ce niveau de contrôle est aussi associé à la répression catabolique (CCR / *carbon catabolite repression*) où l'activation des régulateurs transcriptionnels est couplée à l'état de phosphorylation du PTS et à la possibilité de celui-ci de transférer des groupements phosphoryles aux différents éléments du PTS et des antiterminateurs PRD (119, 188, 380). Concrètement, les antiterminateurs SacY et GlcT de *B. subtilis* ainsi que LacT de *Lactobacillus casei* sont seulement contrôlés négativement par le PTS *via* les enzymes II correspondantes (61, 339), alors que les activités des régulateurs LicT de l'opéron *bglPH* et, à un moindre niveau, GlcT de l'opéron *ptsGHI* chez *B. subtilis* sont fonctions de leur état global de phosphorylation qui dépend lui-même de l'état de phosphorylation des EII et de HPr (71, 120, 323, 337).

Les études portant sur les régulateurs LicT et BglG suggèrent que, pour être actifs, ces antiterminateurs prennent la forme d'homodimère et, bien que de nature différente, les travaux de Ben-Zeev *et al.* (31) suggèrent que le mode de dimérisation de ces régulateurs est similaire. Ainsi, la résolution de la structure quaternaire de l'antitermineur LicT de *B. subtilis*, dont les résidus histidines présents au niveau du domaine PRD2 ont été remplacés par des résidus aspartates afin de simuler en permanence la charge conférée par les

groupements phosphorylés, a confirmé la forme homodimérique de la structure quaternaire (381). Sous cette forme très active, les domaines CAT (co-antitermineur) se croisent et les résidus histidines des deux domaines PRD sont enfouis à l'interface des domaines PRD1-PRD1 et PRD2-PRD2, les rendant inaccessibles à la phosphorylation ou à la déphosphorylation. Ainsi, van Tilbeurgh et Declerck (380) propose un modèle où LicT prend trois formes distinctes : i) la forme monomérique inactive, ii) la forme dimérique ouverte non-phosphorylée ou phosphorylée sur le domaine PRD1 et, enfin, iii) la forme dimérique active où les résidus histidines du domaine PRD2 sont phosphorylés alors que ceux du domaine PRD1 ne le sont pas ou peu (Fig. 16). Sous la forme intermédiaire, l'interface entre les deux domaines PRD est ouverte et le repliement des monomères permet aux groupements histidines des domaines PRD1 et PRD2 de se retrouver au cœur d'une cavité hydrophobe similaire à celle observée au point de contact de HPr avec l'EI (31, 104, 388). Ainsi, HPr et les IIB~P du PTS peuvent phosphoryler les différents résidus His des domaines PRD des antitermineurs selon l'état de phosphorylation global du PTS. Enfin, bien que la phosphorylation au niveau du domaine PRD2 par HPr confère à LicT une activité accrue grâce, entre autres, à une augmentation de la complémentarité électrostatique au niveau de l'interface des PRD2, il est plutôt rare que les quatre sites de phosphorylation soient phosphorylés (31, 66, 208). Afin d'expliquer l'effet négatif conféré par la phosphorylation des résidus histidines des domaines PRD1 autant chez LicT que chez BglG, un antitermineur de l'opéron *bgl* chez *E. coli*, on suppose, suite à des analyses *in silico*, que la présence de groupements phosphorylés au niveau du domaine PRD1 mène à une forte répulsion électrostatique et donc à une incapacité des régulateurs à prendre une forme compacte active (31).

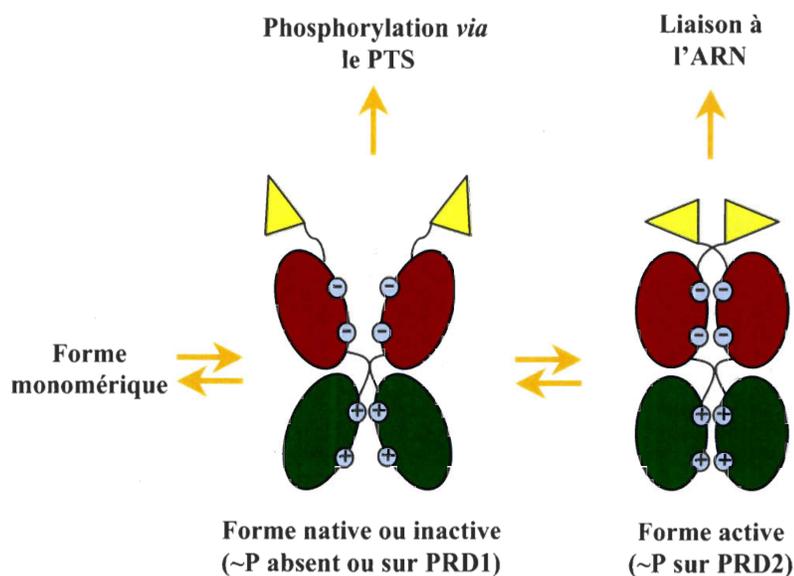


Figure 16 : Antiterminateur LicT de *B. subtilis*. Les domaines PRD1 et PRD2 sont en rouge et vert respectivement, alors que les domaines CAT sont en jaune. Les cercles bleus représentent les sites de phosphorylation alors que le symbole « + » ou « - » indique le pouvoir d'activation ou d'inhibition de ces sites de phosphorylation. Figure inspirée de Van Tilbeurgh et Declerck (380).

Sous la forme active, les antiterminateurs se fixent à une séquence spécifique de l'ARNm nommée RAT (*ribonucleic antiterminator*) et ainsi préviennent l'arrêt prématuré de la transcription (31). De façon générale, ce système de régulation est constitué d'un terminateur précédé d'une séquence RAT, un palindrome de 29 bases formant une structure tige et boucle qui chevauche ou est contiguë à la section 5' de la séquence terminatrice présente sur l'ARNm (70, 324). Cette dernière forme aussi une structure en tige et boucle mais de stabilité moindre que celle obtenue par le terminateur (70, 324). Tout en se distinguant de la terminaison intrinsèque, ce système de terminaison est aussi considéré ρ -indépendante (70, 217). Brièvement, lors d'une terminaison de ce type et en absence de l'antiterminateur, l'ARN polymérase croise la séquence terminatrice présente qui mènera à la forme d'une structure de tige et boucle riche en G+C sur l'ARNm naissant (Fig. 17A). Cette structure, située entre le site d'initiation de la transcription et le codon de départ, force la polymérase à marquer une pause suffisamment longue pour qu'elle finisse par se décrocher du transcrit et de l'ADN. En présence d'un antiterminateur activé, la structure en tige et boucle de la séquence RAT est stabilisée ce qui la favorise par rapport à celle formée par le terminateur et, puisque les séquences se chevauchent ou sont très près l'une de

l'autre, les deux structures ne peuvent coexister (Fig. 17B) (26, 153, 217). La liaison de l'antitermineur avec la séquence RAT est assurée par le domaine CAT présent sur l'ensemble des régulateurs PRD de ce type. Ce domaine est composé de quelques 55 résidus et a une structure en feuillet β (26). Il interagit avec le sillon mineur de l'ARN double brin formé par deux structures internes de type boucle et une structure de type tige les séparant (70).

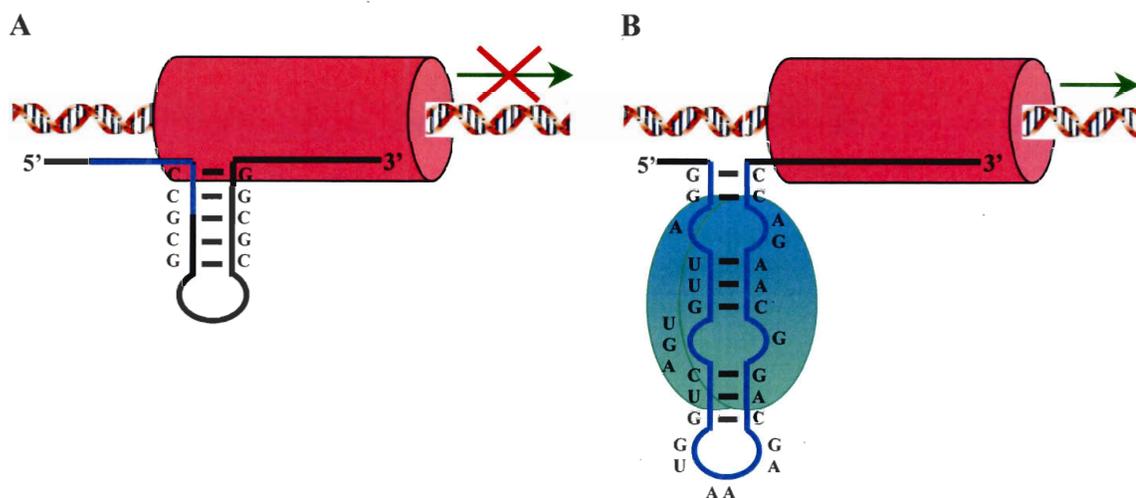


Figure 17 : Représentation schématique de l'antitermination *via* un régulateur de type PRD. A) Arrêt de la transcription *via* un terminateur ρ -indépendant situé entre le site de l'initiation de la transcription et le codon de départ. B) Liaison de l'antitermineur actif SacT à la séquence RAT (bleu) de l'opéron *sacPA*, ce qui bloque la formation du terminateur ρ -indépendant.

Bien que la liaison du régulateur à la séquence RAT est suffisante pour empêcher l'arrêt de la terminaison (67, 382), certaines études suggèrent que les antitermineurs agiraient à différents niveaux *via* des interactions avec l'ARN polymérase (17) et la stabilisation de l'extrémité 5' de l'ARNm (260). En effet, les travaux *in vitro* et *in vivo* de Nussbaum-Shochat et Amster-Choder (260) ont démontré que l'antitermineur BglG de *E. coli* se lie en N-terminal de la sous-unité β' de l'ARN polymérase. *In vitro*, cette liaison ne nécessite pas la présence d'ARN et, lorsqu'il est uni à la sous-unité β' , BglG est incapable d'agir à titre d'antitermineur. Les auteurs posent l'hypothèse que le rôle de la liaison de BglG à la polymérase pourrait servir à faciliter les étapes subséquentes de la transcription plutôt que l'antitermination. Par exemple, il pourrait activer le complexe d'élongation garantissant ainsi la transcription complète de l'opéron (260). De la même façon, les travaux de Gulati

et Mahadevan (125) ont permis de démontrer une augmentation par un facteur cinq de la stabilité de l'ARNm en présence de l'antitermineur BglG actif. De fait, des expériences de dégradation de l'ARN leur ont permis d'observer une stabilisation en 5' du site de fixation de l'antitermineur, alors qu'aucune protection ne semblait être conférée en 3'. Ils proposent d'ailleurs que ce mécanisme sert à stabiliser la population de BglG en réquisitionnant ceux-ci sur l'ARN. Pour terminer, notons que ces rôles supplémentaires n'ont été observés et confirmés que pour l'antitermineur BglG de *E. coli*.

Les activateurs transcriptionnels de type PRD, présents majoritairement chez les bactéries à Gram positif, sont composés d'environ 600 résidus. Leur représentation chez les Firmicutes est importante. Ils ont été identifiés chez *S. mutans*, *Clostridium acetobutylicum*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. casei* et divers bacilles dont *B. subtilis* qui compte au moins quatre activateurs de la transcription de type PRD (125). Tout comme pour les antitermineurs, il existe deux catégories d'activateurs transcriptionnels de type PRD. Ces deux catégories d'activateurs se distinguent notamment par l'organisation des divers domaines qui les composent ainsi que par le mode de régulation du PTS sur ceux-ci. Les activateurs PRD de type MtlR (Fig. 15B) sont modulaires et possèdent deux domaines PRD, un motif de liaison à l'ADN, situé en N-terminal et sont composés de un ou deux domaines de type HTH similaires à ceux retrouvés chez les familles de répresseurs DeoR et d'activateurs LysR (380). Enfin, les activateurs portent, en C-terminal, un domaine IIB^{Gat} suivi d'un domaine IIA^{Mtl} (70). Les activateurs de cette catégorie participent à la régulation de gènes codant généralement pour des transporteurs liés au transfert de sucres par le PTS des familles du mannitol, du lactose et du glucitol (70). Ces régulateurs comprennent entre autres MtlR de *G. stearothermophilus*, LicR et YjdC (anciennement ManR) de *B. subtilis*, qui contrôlent respectivement l'expression de gènes liés au métabolisme du mannitol, de l'opéron *licBCAH* ainsi que des gènes liés au métabolisme du mannose (70, 337). Les activateurs PRD de la deuxième catégorie (Fig. 15C) sont aussi modulaires mais présentent une structure différente de celle observée chez les membres de la première catégorie. Outre le domaine HTH de fixation à l'ADN, les deux domaines PRD sont séparés de quelques 200 résidus et le deuxième est partiellement tronqué en C-terminal. Un domaine de liaison au facteur σ^{54} de l'ARN polymérase (domaine NiFA/NtrC) contenant un motif Walker A et B, nécessaire à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, est situé entre le domaine HTH et le

domaine PRD1 (65, 70, 141, 142, 223, 224). Enfin, on retrouve les domaines IIA^{Man} et IIB^{Gat} entre les deux domaines PRD (71, 122). Les activateurs de type NifA/NtrC participent à la régulation de gènes codant généralement pour des transporteurs liés au transport par le PTS de sucres des familles du mannose et du lactose (70). L'activateur le plus étudié appartenant à cette catégorie est sans contredit LevR de *B. subtilis*, un activateur contrôlant l'expression de l'opéron *lev* (65).

Le PTS exerce un contrôle antagoniste chez les activateurs transcriptionnels. Chez MtlR, un régulateur de type DeoR, HPr(His~P) transfère son groupement phosphorylé aux deux résidus His du domaine PRD2 (141) alors que chez LevR, un régulateur de type NifA/NtrC, le transfert s'effectue au niveau du résidu His du domaine IIA^{Man} (71, 223, 234). Dans les deux cas, cette phosphorylation agit positivement sur l'activité du régulateur. De même, les domaines IIB des enzymes EIICB^{Mtl} et EIIB^{Lev} (LevE) transfèrent respectivement leur groupement phosphorylé au résidu His du domaine IIA^{Mtl/Fru} de MtlR et au seul résidu His du domaine tronqué PRD2 chez LevR (142, 223, 234). La phosphorylation des activateurs PRD par les IIB~P diminue l'activité des régulateurs. Chez MtlR et LevR, les résidus His des domaines PRD1 ne semblent pas être phosphorylés par un composant du PTS. Dans le cas de MtlR, il a été suggéré que le domaine PRD1 servirait d'intermédiaire entre le domaine PRD2 et le site de fixation à l'ADN en facilitant le transfert du signal produit par la phosphorylation des résidus His (70). En effet, la délétion des résidus His du domaine PRD1 diminue l'activation du régulateur observée par la phosphorylation des résidus His au niveau du domaine PRD2 (141). Pour LevR, compte tenu de la présence d'un domaine NifA/NtrC, il est proposé que ces derniers agissent de façon similaire aux régulateurs de la famille NifA/NtrC n'ayant pas de domaine PRD où la phosphorylation d'une protéine complémentaire accroît l'activité ATPase du domaine NifA/NtrC qui stimule à son tour la formation de complexes ouverts par l'ARN polymérase (400). Ainsi, Deutscher *et al.* (70) suggèrent que la phosphorylation du domaine IIA^{Man} stimule l'activité ATPase de l'activateur alors que la phosphorylation du domaine PRD2 l'inhibe et que ces signaux pourraient être transmis *via* le domaine PRD1. Enfin, tout comme chez LiT, un antitermineur PRD, l'absence de phosphorylation par HPr(His~P) chez les deux catégories d'activateurs conduit à un mécanisme de CCR indépendant de CcpA (70).

En conclusion, le PTS transmet aux régulateurs transcriptionnels PRD des signaux indicateurs de changements environnementaux. Bien qu'il existe des exceptions pour les diverses classes d'antiterminateurs et d'activateurs, de façon générale, la phosphorylation des régulateurs transcriptionnels par HPr(His~P) résulte en une activation de ceux-ci alors que la phosphorylation de résidus His par les domaines IIB les inhibe.

1.3.3.2 HPr(Ser-P)

Chez plusieurs bactéries à Gram positif, HPr peut être phosphorylée de façon réversible sur un résidu sérine retrouvé en position 46 *via* l'activité ATP-dépendante de la HPr kinase/phosphorylase (44, 94, 274, 389). Le pyrophosphate (PP_i) peut aussi être employé lors de la phosphorylation de HPr par la HprK/P (240). Cette enzyme bifonctionnelle catalyse à la fois la phosphorylation et la déphosphorylation du résidu Ser₄₆ de HPr. Elle présente une structure quaternaire hexamérique composée de deux trimères auxquels six molécules de HPr se fixent (88). Le lien phosphoester créé par la HprK/P est thermostable de sorte que, contrairement au groupement phosphorylé lié au résidu His₁₅, le groupement phosphorylé lié au résidu Ser₄₆ ne peut être transféré à d'autres molécules.

HPr(Ser-P) participe à la répression et, à un moindre niveau, à l'activation catabolique (CCR et CCA, respectivement). La CCR et la CCA permettent à la bactérie de coordonner et d'optimiser l'utilisation de sources de sucres disponibles dans l'environnement. Ainsi, en présence de plusieurs sucres différents, la cellule a la capacité de métaboliser de façon préférentielle ou exclusive le sucre dont le rendement énergétique est le plus élevé. Les sucres restants seront alors pris en dernier recours par ordre d'efficacité énergétique. Pour ce faire, HPr(Ser-P) contribue à la CCR de deux façons : en premier lieu, il participe à l'exclusion d'inducteur grâce à l'inhibition allostérique de transporteurs, ce qui prévient l'entrée ou la rétention d'inducteurs (70, 308, 410) et, en second lieu, il interagit avec des régulateurs transcriptionnels (Fig. 18). Chez les bactéries à Gram positif, la CCR *via* les régulateurs transcriptionnels fonctionne par des mécanismes où HPr(Ser-P) se fixe à la protéine régulatrice CcpA afin de contrôler l'expression de gènes dont la région promotrice contient des séquences *cre* (357). Plus récemment, un nouveau répresseur pouvant se fixer à HPr(Ser-P) a été identifié. En effet, des études *in vitro* montrent que le répresseur de

l'opéron codant pour les gènes impliqués dans le transport du ribose chez *B. subtilis*, RbsR, doit se fixer à HPr(Ser-P) pour être en mesure de former un complexe avec l'ADN (252).

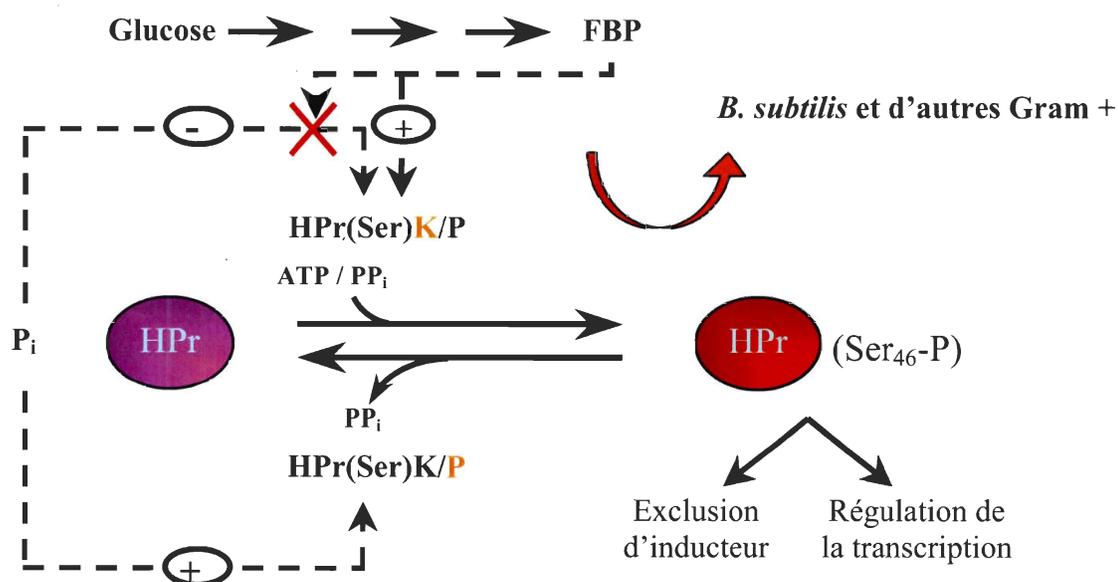


Figure 18 : Rôles de HPr(Ser-P) chez les bactéries à faible contenu en G+C.

1.3.3.2.1 L'exclusion et l'expulsion d'inducteur

En présence d'un sucre rapidement métabolisable, la cellule consomme ce dernier de façon préférentielle et exclut les autres sources de carbone et/ou d'énergie. Chez certaines bactéries à Gram positif, HPr(Ser-P) participe au contrôle de l'exclusion d'inducteur (80, 245, 386). En effet, bien que l'absence de CcpA chez *L. casei* et *L. lactis* ne résulte pas en une incapacité de ces souches à exclure des inducteurs, l'absence de HPr(Ser-P) (mutation en position Ser₄₆ ou Ile₄₇) l'abolit complètement. De la même façon, les mutants *hprK* de *L. casei*, incapable de phosphoryler HPr sur le résidu Ser₄₆, donnent les mêmes résultats. De même, les travaux de Gauthier *et al.* (109) et ceux de Plamondon *et al.* (271) démontrent chez *S. salivarius* que le remplacement de l'isoleucine en position 47 par une thréonine ou la mutation de la méthionine en position 48 par une valine soutire à la cellule la capacité à discriminer entre les sucres PTS et non PTS présents dans son environnement, et ce, malgré la présence de HPr(Ser-P) en quantité similaire à ce qui est observé chez la souche parentale. Ces résultats suggèrent une inhibition allostérique de transporteurs par HPr(Ser-P) ou une dépression des gènes impliqués dans le catabolisme de sucres non-PTS. Il n'en demeure pas moins que, pour ces souches, aucune démonstration directe n'a été faite pour l'instant (109, 357, 412).

HPr(Ser-P) pourrait, par l'activation de sucre-phosphatase, être impliquée dans l'expulsion d'inducteur chez quelques bactéries à Gram positif. Le modèle proposé suggère que la déphosphorylation de sucres non métabolisables provoquerait leur expulsion et limiterait leur accumulation à l'intérieur de la cellule (286, 386, 411). Bien que l'expulsion d'inducteurs ait été observée chez *L. casei*, *L. lactis* et *Lactobacillus brevis*, des études récentes démontrent que HPr(Ser-P) n'y participe pas toujours directement et qu'elle peut avoir lieu même en absence de cette dernière (79, 80, 245). Ainsi, alors que chez *L. casei*, HPr(Ser-P) est impliqué directement dans l'exclusion du maltose, il ne serait pas nécessaire à l'expulsion du thio-méthyl- β -D-galactopyranoside (246). En revanche, selon le modèle proposé par Djordjevic *et al.* (79), l'expulsion du galactose en présence de glucose chez *L. brevis* nécessiterait l'apport de HPr(Ser-P). En effet, les auteurs avancent qu'à l'addition du glucose dans un milieu contenant du thio-méthyl- β -D-galactopyranoside, un analogue non métabolisable du galactose, il y aurait une augmentation de la concentration cellulaire de FBP. Celui-ci activerait alors la fonction kinase de la HprK/P qui phosphorylerait à son tour HPr sur le résidu sérine. Ce HPr(Ser-P), par interaction allostérique avec le transporteur de type symport galactose :H⁺, le convertirait en transporteur de type uniport qui expulserait le thio-méthyl- β -D-galactopyranoside. Un deuxième modèle propose qu'une sucre-P phosphatase activée par HPr(Ser-P) participerait à la réaction couplée de l'hydrolyse du groupement phosphoryle présent sur les sucres-P suivit de leurs expulsion par leur transporteurs associés (70, 409). La présence de cette sucre-P phosphatase a été démontrée chez *L. lactis*, *E. faecalis* et *S. pyogenes* mais elle serait absente chez *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, et *B. subtilis*, des organismes ne présentant pas le phénomène d'expulsion d'inducteur (409). Ces résultats supportent la thèse selon laquelle l'expulsion d'inducteur par l'intermédiaire de HPr(Ser-P) ne serait pas un mécanisme retrouvé chez toutes les espèces de bactéries à faible contenu en G+C.

1.3.3.2.2 Régulation de l'expression des gènes *via* HPr(Ser-P)

La régulation de l'expression des gènes par HPr(Ser-P) est un mécanisme complexe nécessitant l'apport de plusieurs facteurs. Dans ce cadre, HPr(Ser-P) agit à titre de co-répresseur ou co-activateur avec CcpA, un membre de la famille des répresseurs LacI/GalR. Ce complexe est retrouvé sous la forme de dimère et contrôle l'expression d'environ 10% des gènes chez *B. subtilis* et *S. mutans* (5, 250). Cette régulation est partie intégrante des mécanismes de CCR et CCA. Lors de régulations métaboliques dépendantes de CcpA, l'enzyme HprK/P joue un rôle clé. En effet, l'activité de cette enzyme bifonctionnelle est affectée par les variations de l'environnement et répond rapidement à ces variations en modifiant les niveaux de HPr(Ser-P). Ainsi, en présence de sucres rapidement métabolisables et, selon l'espèce, de FBP, l'activité kinase de l'enzyme HprK/P est favorisée alors que des niveaux élevés de phosphate inorganique stimulent l'activité phosphorylase.

HprK/P est une enzyme de près de 325 résidus. Chez les α -protéobactéries, chez qui le rôle exact de l'enzyme demeure incertain, il existe une forme de la kinase tronquée de 150 résidus en N-terminale (274, 389). Cette partie en N-terminale de HprK/P consiste en un domaine dont la fonction exacte n'est pas encore définie. En effet, l'étude d'un mutant de la bactérie à Gram positif *L. casei*, dont la section N-terminale de HprK/P a été éliminée, montre que l'enzyme est en mesure d'effectuer toutes les tâches qui lui sont connues (89). Les analyses de comparaison de séquences en acides aminés démontrent une similitude entre le domaine N-terminal de HprK/P et le sous-domaine α/β de l'enzyme I. Cette observation suggère que ce domaine servirait aux interactions avec des métabolites phosphorylés. Les HprK/P possèdent toutes un motif de type Walker A (155-GDSGVGKS-162 chez *L. casei*) qui est généralement associé aux sites de fixation des nucléotides. Ce motif, aussi dénommé « *P-loop* », est retrouvé chez la PEP carboxykinase et la cytidine monophosphate (CMP) kinase de *E. coli*, deux enzymes impliquées dans la phosphorylation de métabolites (89, 102). La boucle-P se lie à l'ATP, le pyrophosphate et une ou deux molécules de phosphate inorganique (P_i) (89, 222). Chez *L. casei*, le P_i se fixe au niveau de la position occupée par le phosphate β de l'ATP, alors que chez *S. xylosum*, ce sont les positions occupées par les phosphates β et γ qui sont prises. D'ailleurs, le site de

fixation des molécules de phosphate inorganique au sein du site actif de la HprK/P explique pourquoi le P_i agit à titre d'inhibiteur de l'activité kinase. En présence de hautes concentrations de P_i , il y a compétition pour les sites de fixation sur le motif Walker A et, dans ces conditions, la fixation de l'ATP est défavorisée.

En plus du motif Walker A, toutes les HprK/P possèdent une seconde région conservée (IEL)-E-(IV)-R-G-(ILMV)-G-(IV)-(ILM) (résidus 203 à 211 chez *L. casei*). Cette région, unique aux HprK/P, est nommée séquence signature et sa fonction est surtout attribuée aux événements de déphosphorylation (272, 287). Enfin, une série de résidus clés ont été identifiés comme étant importants aux activités de l'enzyme, à savoir les résidus His₁₄₀, Gly₁₄₈ ainsi que les Asp 178 et 179 (chez *L. casei*), conservés dans l'ensemble des HprK/P répertoriées (102). Le résidu His₁₄₀ interagit avec le résidu Ser₄₆ de HPr et servirait d'intermédiaire entre ce dernier et l'ATP ou le PP_i. L'abolition de la Gly₁₄₈ de même que l'un ou l'autre des deux résidus Asp (position 178 et 179), résulte en une perte des deux activités de l'enzyme (134). Alors que le résidu Asp₁₇₉, tout comme His₁₄₀, se lie à HPr lors de la phosphorylation de ce dernier, aucun rôle n'est encore associé au résidu Asp₁₇₈.

Enfin, chez certains organismes, la présence de FBP stimule l'activité kinase de la HprK/P (164). C'est le cas entre autres chez *B. subtilis* où des travaux menés sur la HprK/P montrent que le FBP induit un changement de conformation de l'enzyme favorisant la fixation de l'ATP au site actif. En revanche, le FBP est sans effet en présence de pyrophosphate. En effet, même en absence de l'effecteur, la fixation du PP_i au site actif de la HprK/P n'est pas gênée (272).

CcpA joue un rôle central dans la répression et l'activation cataboliques chez les bactéries à Gram positif. Elle a été répertoriée chez plus de 74 bactéries, toutes faisant parties des Firmicutes (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR006377>). Son rôle au niveau de la CCR a fait l'objet de plusieurs études et revues mais son rôle dans la CCA est moins connue. Le modèle actuel stipule que deux molécules de HPr(Ser-P) se lient à un dimère de CcpA. Ce complexe se fixe alors aux séquences *cre* de certaines régions promotrices et effectue une activation ou une répression des gènes sous le contrôle de ces promoteurs selon que la séquence *cre* est située en amont ou en aval du dit promoteur (158). HPr(Ser-P) est la seule forme pouvant se lier efficacement à CcpA, les formes libres et

doublement phosphorylées de HPr ainsi que la forme phosphorylée sur His₁₅ n'ayant que de faibles affinités et donc aucun impact quant à l'affinité de CcpA pour la séquence *cre* (74, 169). L'obtention d'une forte CCR repose sur divers facteurs. Par exemple, le contexte génomique où se retrouvent la séquence *cre* peut participer à promouvoir l'interaction entre l'ADN et le complexe CcpA/HPr(Ser-P) (243, 364, 414). Le FBP, le NADP⁺ ainsi que le glucose-6-phosphate (G6P) peuvent aussi participer à augmenter légèrement l'affinité de CcpA à la séquence *cre* (180, 252, 280). Ainsi, le FBP et le NADP⁺ augmentent l'affinité de CcpA pour les séquences *cre* du promoteur du gène codant pour l' α -amylase de *B. subtilis* par un facteur 2 et 1,5 respectivement, alors que HPr(Ser-P) l'augmente par un facteur 10. Par contre, l'effet le plus marqué est observé en présence des complexes CcpA/NADP/HPr(Ser-P) et CcpA/FBP/HPr(Ser-P) où l'augmentation de l'affinité de la liaison du complexe à l'ADN est alors de 120- et 300-fois respectivement. Les travaux de Horstmann *et al.* (252) sur le rôle du FBP et du G6P viennent en partie expliquer ce phénomène qui est probablement du même type que celui observé pour le NADP⁺. Leurs travaux suggèrent que ces deux métabolites viennent stimuler le contact entre le résidu His₁₅ de HPr(Ser-P) et Asp₂₉₆ de CcpA favorisant du coup la formation d'un complexe HPr(Ser-P)/CcpA stable. De même, leurs travaux montrent que la liaison de ce complexe aux séquences *cre* est assurée par l'interaction du résidu ¹⁷Arg de HPr qui, en interagissant avec les résidus Asp en position 84, 69' et 99' viendrait activer la rotation des sous-domaines en N-terminal, essentiel à la formation d'une conformation permettant la liaison à l'ADN ou stabiliser cette dite conformation. Enfin, bien qu'il arrive que plusieurs séquences *cre* soient présentes pour un seul gène (250), toutes ne sont pas nécessairement reconnues par CcpA (364).

En comparaison, peu d'information est disponible quant au rôle de HPr(Ser-P) lors de l'activation catabolique. En effet, bien qu'il existe quelques exemples d'activation catabolique suivant le mécanisme proposé pour CcpA (364), la plupart des gènes sous le contrôle positif de CcpA n'ont pas de séquence *cre*. L'absence de cette séquence démontre que le mécanisme établi pour la CCR n'est pas toujours applicable lors de la CCA (37, 250). Ainsi, l'opéron *gapA* de *B. subtilis* nécessite la présence de CcpA afin d'être induit par le glucose et ce, malgré l'absence de séquence *cre* (215, 237).

L'analyse du transcriptome de *B. subtilis* en présence de glucose montre que CcpA est impliqué dans la régulation de gènes participant au métabolisme de l'azote (CCA et CCR), du phosphate (CCA) et des protéines de stress (CCR) (212). De plus, elle a permis de démontrer l'implication relative de HprK/P et de CcpA dans la régulation des gènes sensibles à la CCR; relation absente en CCA. En effet, CcpA contrôle jusqu'à 96% des gènes sensibles à la CCR lorsque *B. subtilis* croît en présence de glucose. Chez un mutant HPr(S46A), on observe une sensibilité partielle à la CCR alors qu'en présence de mutant CcpA ou HprK/P négatif, la CCR est complètement abolie. L'absence d'abolition complète chez le mutant HPr(S46A) de *B. subtilis* est en partie attribuable à la protéine Crh (*catabolite repression HPr*). Cette dernière présente 45% d'identité avec HPr et possède aussi un résidu Ser₄₆ qui peut être phosphorylé par HprK/P (101). Ainsi, Crh peut agir à titre de co-répresseur et compenser en partie l'absence de HPr(Ser-P), ce qui résulte en un maintien partiel de la CCR (212, 225). D'ailleurs, certains avancent que le maintien partiel est le reflet de la différence d'expression de HPr par rapport à Crh, ce dernier n'étant pas présent en assez grand nombre pour compenser pleinement l'absence de HPr(Ser-P) (118). D'autres l'expliquent en partie par le fait que le résidu Arg₁₇ de Crh(Ser-P) contrairement à HPr(Ser-P), est incapable de stabiliser la conformation permettant la fixation aux séquences *cre* compte tenu qu'il interagit seulement avec le résidu Asp₉₉ de CcpA (252).

1.3.3.3 HPr(Ser-P)(His~P)

En plus de ses deux formes monophosphorylées, HPr peut, chez certains organismes, être retrouvée sous la forme doublement phosphorylée, HPr(Ser-P)(His~P). La présence de cette forme de HPr a été observée à des concentrations importantes (>50%) chez *S. salivarius*, *S. mutans* et *S. thermophilus* (56, 369). En revanche, des niveaux très faibles ou l'absence de HPr(Ser-P)(His~P) ont été rapportés chez *B. subtilis* (56), *L. lactis* (247), *E. faecalis* (245) et *Streptococcus bovis* (196). Ces résultats sont d'ailleurs supportés par diverses études démontrant que la vitesse de la réaction de phosphorylation de HPr(Ser-P) par l'enzyme I est de 1000 à 5000 fois plus lente que celle observée avec HPr libre (48, 398). De la même façon, la phosphorylation de HPr(His~P) par la HprK/P est peu efficace (71, 292, 293).

Chez *S. thermophilus* et *S. salivarius*, HPr(Ser-P)(His~P) est en mesure de phosphoryler, *in vitro*, le domaine IIA du transporteur LacS (56). Cochu *et al.* proposent que cette forme de HPr pourrait servir à limiter la concentration de HPr(His~P) dans la cellule durant la phase exponentielle de croissance. Cette diminution de HPr(His~P) résulterait en une baisse de phosphorylation des domaines PRD (207) tout en permettant à la cellule de conserver sa capacité à phosphoryler les domaines IIA nécessaire au transport des sucres. De même, HPr(Ser-P)(His~P) n'est pas en mesure d'interagir avec CcpA, ce qui pourrait aussi exercer un certain contrôle sur la CCR et la CCA. Enfin, les études de cinétique effectuées par Casabon *et al.* (48) suggèrent que les fortes concentrations de HPr(Ser-P)(His~P) chez *S. salivarius* résulteraient de la stimulation de la phosphorylation de HPr(Ser-P) à des pH intracellulaires acides couplée à la forte concentration intracellulaire de HPr(Ser-P). En effet, ils ont observé que la capacité de l'EI à phosphoryler HPr(Ser-P) augmente de façon importante à des pH acides similaires à ceux retrouvés chez des cellules en phase exponentielle de croissance. Ils posent l'hypothèse qu'à ces pH, il y a neutralisation partielle des charges présentes sur les résidus Ser₄₆-P de HPr et Glu₈₄ de l'EI. Cette neutralisation limiterait la répulsion électrostatique observée à pH neutre. Par contre, la présence d'un groupement phosphoryle au niveau du résidu sérine cause de l'encombrement stérique qui limiterait la capacité à l'EI à se lier correctement à son substrat. Ce problème serait alors pallié par les concentrations élevées de HPr(Ser-P) qui sont de l'ordre du 500 µM. Tel qu'avancé par Casabon *et al.* (48), ce mécanisme sous-tend l'importance de l'acidification intracellulaire de la cellule. En conséquence, les genres bactériens qui maintiennent, en cours de croissance, un pH intracellulaire près de la neutralité, tel les bacilles et les entérocoques, seraient incapables de synthétiser des niveaux importants de HPr(Ser-P)(His~P). À la lumière de ces résultats, un nouveau modèle a été proposé pour les cellules où de fortes concentrations de HPr doublement phosphorylées ont été retrouvées. Par conséquent, le contrôle du métabolisme des sucres serait assuré en partie par HPr(Ser-P) pour tout ce qui a trait aux régulations CcpA-dépendante et l'exclusion d'inducteur alors que HPr(Ser-P)(His~P) assurerait le transport des sucres PTS (48). Enfin, la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) permettrait également à la cellule de maintenir des niveaux de HPr(His~P) faibles ce qui empêcherait la phosphorylation des régulateurs transcriptionnels possédant des domaines PRD (voir section 1.3.3.1.3, page 29).

1.4 Objectifs et hypothèses

Chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, et en particulier chez les streptocoques, le rôle et l'importance de HPr dans le contrôle de la régulation des gènes sont bien documentés. Cependant, bien que l'importance de la présence de HPr(Ser-P)(His~P) soit établie chez quelques streptocoques et que quelques fonctions y soit associées, la présence et les fonctions de cette forme de HPr demeurent un sujet de controverses. Ainsi, alors que Cochu *et al.* (56) ont montré que les concentrations de HPr(Ser-P)(His~P) pouvaient représenter 75% des HPr totaux en phase exponentielle de croissance chez *S. thermophilus*, Gunnewijk et Poolman (127) ont trouvé des concentrations inférieures à 5%. Deux différences de nature méthodologique peuvent potentiellement expliquer cette divergence. Premièrement, elle pourrait découler du fait que la souche utilisée était différente. Deuxièmement, cette différence pourrait être attribuable au fait que la méthode employée pour mesurer les niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr était différente, Cochu *et al.* (56) ayant utilisé une méthode d'immunoélectrophorèse croisée (369) alors que Gunnewijk et Poolman (127) ont utilisé une approche de dosage par immunobuvardage.

La procédure de quantification faisant appel à l'immunoélectrophorèse croisée élaborée par Vadeboncoeur *et al.* (369) met à profit les différences de migration électrophoretique et de thermostabilité des différentes formes de HPr. Dès lors, ceci permet de séparer ces dernières et de les doser de façon spécifique et proportionnelle à leur concentration intracellulaire (369). C'est d'ailleurs par cette méthode qu'il a été possible de déterminer des concentrations élevées de HPr doublement phosphorylée chez les streptocoques oraux. De plus, les travaux de Casabon *et al.* (48) suggèrent un mécanisme où l'acidification intracellulaire des cellules en croissance exponentielle permettrait d'assurer un taux de phosphorylation raisonnable de HPr(Ser-P) par l'EI. La venue de ces nouvelles connaissances sur le mécanisme probable de synthèse de HPr(Ser-P)(His~P), ainsi que la divergence observée entre deux souches de la même espèce mais ayant été analysées par des méthodes différentes, laisse planer le doute quant à la fiabilité des résultats obtenus par immunobuvardage. Finalement, dans la majorité des études rapportant des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr, la méthode employée pour récolter les

cellules ne permettait pas d'inactiver les activités des enzymes EI et HprK/P contrairement à la méthode développée par Vadeboncoeur *et al.* (369).

Dans un premier temps, ces travaux poursuivent les objectifs suivants : i) démontrer que les bactéries de la classe des *Bacilli* du groupe des Firmicutes incapable de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité sont en mesure de produire et de maintenir des taux importants de HPr(Ser-P)(His~P), ii) démontrer que la méthode utilisée ainsi que la rigueur selon laquelle les échantillons sont préparés et analysés ont un impact sur les ratios mesurés des différentes formes de HPr et, finalement, iii) déterminer si HPr(Ser-P)(His~P), tout comme HPr(His~P), est en mesure de transférer son groupement phosphorylé présent sur le résidu ¹⁵His aux domaines IIA des complexes d'enzymes II et de la glycérol kinase.

Pour vérifier ces hypothèses, les différentes formes de HPr seront dosées à la fois par la méthode d'immunobuvardage et celle d'immunoélectrophorèse croisée chez diverses bactéries appartenant à la classe des *Bacilli*. Les conditions d'obtention des échantillons à analyser seront revues afin de mesurer leurs impacts sur les ratios mesurés des différentes formes de HPr. Enfin, des essais de phosphorylation *in vitro*, en système hétérologue, de la glycérol kinase de *E. casseliflavus* par HPr(Ser-P)(His~P) seront réalisés et des cinétiques de phosphorylation des enzymes IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} par HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P) seront effectuées afin de vérifier si la forme doublement phosphorylée de HPr est en mesure d'effectuer ces tâches.

Le rôle de HPr(Ser-P) dans la régulation de l'expression de gènes *via* la CCR et la CCA est bien établie chez les bacilles. Ainsi, la présence du régulateur CcpA de même que la présence de séquences *cre* retrouvées chez diverses bactéries de la classe des *Bacilli* suggèrent que HPr(Ser-P) assurerait un rôle similaire chez plusieurs bactéries à faible G+C. De la même façon, il est établi que HPr(His~P), *via* la phosphorylation ou la déphosphorylation de régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD, participent à la régulation de l'expression des gènes. La présence de séquences RAT chez plusieurs streptocoques (*European Bioinformatics Institute*), séquence nécessaire à la régulation par les antiterminateurs PRD, suggère que HPr(His~P) pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la transcription chez ce genre bactérien. En conséquence,

nous avons étudié le rôle de HPr(His~P) dans la régulation de la transcription chez *Streptococcus salivarius* en réalisant une étude comparative des protéomes de la souche parentale ATCC 25975 et du mutant G71, une souche EI⁻ incapable de produire HPr(His~P).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches et plasmides employés au cours de cette étude sont répertoriés dans le Tableau 2. Les souches de *S. salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *S. bovis* et *E. faecalis* ont été cultivées à 37°C dans un milieu contenant 10 g de tryptone (Difco Laboratories), 5 g d'extrait de levures (Difco Laboratories), 2,5 g de NaCl, et 2,5 g de Na₂HPO₄ par litre. *S. pneumoniae* et *Streptococcus suis* ont été cultivées à 37°C dans du milieu THB (*Todd-Hewitt Broth*, Difco Laboratories). Les lactocoques ont été cultivés à 30°C dans du milieu M17 (Difco Laboratories). *B. subtilis* a été cultivée avec agitation à 37°C dans du milieu LB (*Luria-Bertani*). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *L. casei* ont été cultivées à 37°C dans du milieu MRS (*de Man, Rogosa, Sharpe*, Difco Laboratories). *S. aureus* a été cultivée avec agitation à 37°C dans du milieu BHI (*Brain-Heart Infusion*, Difco Laboratories). Enfin, les différentes souches de *E. coli* employées au cours de cette étude ont été cultivées à 37°C avec agitation dans du milieu LB. Les différents sucres employés

ont été stérilisés par filtration (filtre Millipore, 0,22 μm) et, à moins d'indications contraires, ont été ajoutés aseptiquement aux milieux à une concentration finale de 0,4% lorsque les cellules étaient récoltées en phase exponentielle de croissance, ou de 0,2% lorsque les cellules étaient récoltées en phase stationnaire de croissance. Dans le cas de *E. coli*, aucun sucre n'était ajouté au milieu. La croissance était suivie par lecture de la densité optique à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic 20, Thermo Scientific). Les temps de génération ont été déterminés en traçant le graphique du logarithme à la base dix de la densité optique à 660 nm en fonction du temps. Dans les cas où les différentes souches étaient maintenues en culture sur milieu solide, 1,5% (p/v) d'agar était ajouté aux milieux de culture. Après stérilisation, le milieu de culture était versé dans des boîtes de Pétri.

Tableau 2 : Souches et plasmides

Organisme	Souche ^a	Génotype et/ou caractéristiques pertinentes ^b	Source ou référence
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	Souche sauvage	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 35550	Souche sauvage	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	LMG194	F ⁻ Δ lacX74 galE thi rpsL Δ phoA (PvuII) Δ ara714 leu::Tn10, Tet ^r	Invitrogen
	XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
	BL21(DE3) NM522	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁺) [F' proAB lacI ^q Z Δ M15].	Novagen Stratagene
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 4646	Souche sauvage	ATCC
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	KH4	Souche sauvage	Quest International, Chicago, IL
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	ATCC 19257 MG1363	Souche sauvage	ATCC (106)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	Souche sauvage	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Souche sauvage	ATCC
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 35034	Souche sauvage	ATCC
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R800	Souche sauvage	(198)
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975	Souche sauvage	(132)
	G71	Mutant EI ⁻ : Délétion ponctuelle en position 166 du gène <i>ptsI</i> qui introduit un codon d'arrêt (TGA) prématuré	(108)
	A37	Mutant IIAB _L ^{Man} (-)	(195)
	α -S3L11	Mutant employé lors de la purification des IIAB ^{Man}	(371)
<i>Streptococcus suis</i>	ATCC 43765	Souche sauvage	(168)
	24	Souche sauvage	(238)
<i>Streptococcus vestibularis</i>	ATCC 49124	Souche sauvage	ATCC

Plasmide		
pAG2	Protéine fusion His ₆ -HPr de <i>B. subtilis</i> dans pQE30	J. Deutscher, INRA
pBAD/HisB pDR3	Vecteur d'expression, Amp ^r Protéine fusion His ₁₀ -IIAB ^{Man} _H de <i>S. salivarius</i> dans pET19b	Invitrogen (202)
pET19b	Vecteur d'expression, Amp ^r	Novagen
pET28a(+)	Vecteur d'expression, Kan ^r	Novagen
pETI-16	Protéine fusion His ₆ -EI de <i>S. salivarius</i> dans pET28a(+)	(202)
pH46D	Protéine fusion His ₆ -HPr (S46D) de <i>S. salivarius</i> dans pBAD	(48)
pHPKHis	Protéine fusion His ₆ -HprK/P de <i>S. salivarius</i> dans pET28a(+)	
pHPW18	Protéine fusion His ₆ -HPr de <i>S. salivarius</i> dans pBAD	(94)
pQE30	Vecteur d'expression, Amp ^r	Qiagen
pQEglpKEcas	Protéine fusion His ₆ -GlpK de <i>E. casseliflavus</i> dans pQE30	J. Deutscher, INRA
pTML2	Protéine fusion His ₁₀ -IIAB ^{Man} _L de <i>S. salivarius</i> dans pET19b	(202)
pTSHEc	Protéine fusion His ₆ -HPr de <i>E. casseliflavus</i> dans pQE30	J. Deutscher, INRA

^a ATCC: American Type Culture Collection.

^b Tet^r, Amp^r, Kan^r résistance à la tétracycline, ampicilline et kanamycine, respectivement.

2.2 Préparation des fractions solubles et membranaires

L'arrêt de la croissance en phase exponentielle ou stationnaire des différentes cultures a été effectué par l'addition de chloramphénicol (50 µg/ml) aux milieux. Les cellules étaient alors récoltées par centrifugation à 4°C (20 min à 20 000 × g), puis lavées avec du tampon HEPES 50 mM (pH 7,5). Une deuxième centrifugation sous les mêmes conditions permettait la récupération d'un culot cellulaire qui était congelé 1 h à -80°C. Le culot était ensuite broyé 10 min dans un mortier réfrigéré en présence d'alumine (3 g d'alumine par 1 g de cellules humides). La pâte ainsi obtenue était remise en suspension dans une solution de tampon HEPES 10 mM (pH 7,5), contenant 14 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), 0,1 mM de fluorure de phénylméthanésulfonyl (PMSF), 0,1 µM de leupeptine et 0,1 µM de pepstatine. L'alumine était retirée par centrifugation à 4°C (5 min à 3 000 × g) et les cellules ou débris cellulaires étaient centrifugés à 4°C (20 min à 20 000 × g). Le surnageant était récolté et la fraction membranaire était centrifugée à 4°C, de 16 à 18 h à 200 000 × g. Le surnageant, correspondant à la fraction soluble, était prélevé et le culot membranaire était homogénéisé

dans le tampon de resuspension préalablement décrit. Les fractions solubles et membranaires ont été conservées à -80°C .

2.3 Préparation de cellules de *E. coli* électrocompétentes

Les souches de *E. coli* BL21(DE3) et *E. coli* XL1-blue ont été cultivées à 37°C avec agitation dans 1 l de milieu LB. Lorsque la DO des cultures atteignait 0,5 à 0,8, les cultures étaient refroidies sur glace pendant 30 min. Les cellules ont alors été récupérées par centrifugation à 4°C (15 min à $4\,000 \times g$) puis resuspendues sous des conditions stériles dans 1 l d'eau froide stérile. Les cellules ont été soumises à trois cycles additionnels de centrifugation et les cellules ont été resuspendues dans 500 ml d'eau froide stérile, 20 ml de glycérol à 10 % (v/v) et 2 ml de glycérol à 10 % (v/v). Des aliquotes de 50 μl ont été congelées par immersion dans un mélange de glace sèche et éthanol, puis ont été conservées à -80°C pour une durée maximale de 6 mois.

2.4 Synthèse de PEP[^{32}P]

La synthèse de PEP[^{32}P] a été effectuée selon la méthode de Mattoo et Waygood (228) en utilisant l'enzyme purifiée PEP carboxykinase de *E. coli* K-12 HFr 3000, gracieusement offerte par le Dr A. H. Goldie (Université de Saskatchewan). Brièvement, le mélange réactionnel, constitué de HEPES 50 mM (pH 7,5), 5 mM de MgCl_2 , 1 mM d'oxaloacétate, 50 μg de PEP carboxykinase et ≈ 200 nM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (250 μCi à ≈ 6000 Ci/mmol) (GE Healthcare), était incubé 10 min à la température de la pièce. La réaction de synthèse du PEP[^{32}P] (Fig. 19) était arrêtée par dilution du mélange réactionnel (10x). Le PEP[^{32}P] était purifiée par chromatographie sur un échangeur d'anions en utilisant une colonne de Dowex AG-1-X8. L'élution des fractions était réalisée par l'addition d'une solution de bicarbonate de triéthylammonium (TEAB) à des concentrations croissantes. Suite à cette chromatographie, les différentes fractions étaient analysées afin de sélectionner celles contenant uniquement du PEP[^{32}P]. Une aliquote de chacune des fractions a été déposée sur du papier à chromatographie DEAE-cellulose DE 81, un échangeur d'anions légèrement basique. Les molécules étaient séparées à l'aide d'un tampon bicarbonate d'ammonium 0,25 M. Généralement, le PEP[^{32}P] était élué à une concentration de 0,7 M de TEAB.

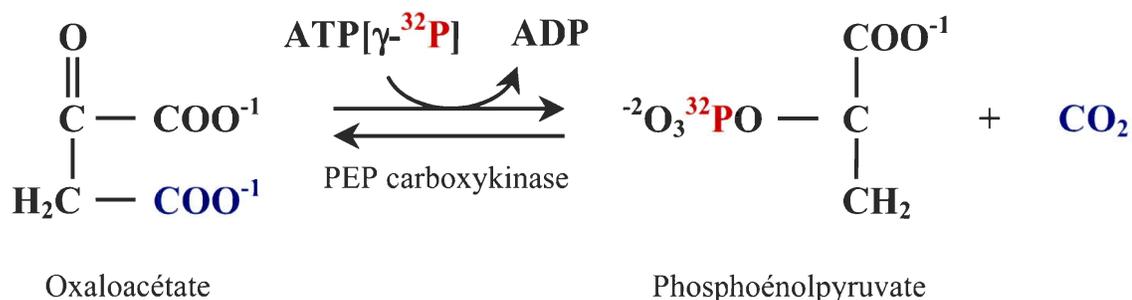


Figure 19 : Réaction de synthèse du PEP à partir de l'oxaloacétate et de la PEP carboxykinase.

L'absence d'ATP dans les fractions contenant le PEP[³²P] était vérifiée par des essais de phosphorylation PEP- et ATP-dépendante. L'essai de phosphorylation aux dépens du PEP était effectué dans un mélange réactionnel constitué de HEPES 20 mM (pH 7,5), 50 mM de MgCl₂, 1 μM de EI, 10 μM de HPr et 40 pM de PEP[³²P] (0,05 μCi à ≈ 6000 Ci/mmol). L'essai de phosphorylation aux dépens de l'ATP était effectué dans un mélange réactionnel constitué de HEPES 20 mM (pH 7,5), 3 mM de MgCl₂, 1 μM de HprK/P, 10 μM de HPr et 40 pM de la préparation de PEP[³²P] purifiée (0,05 μCi à ≈ 6000 Ci/mmol). Les mélanges réactionnels étaient incubés 10 min à la température de la pièce et les réactions étaient arrêtées par l'addition d'un demi volume de tampon de dénaturation constitué de 180 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM de SDS, 30%(v/v) de glycérol, 2 M de β-mercaptoéthanol et 0,003% (p/v) de bleu de bromophénol. Une fraction de chaque essai a été chauffée à 100°C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) en utilisant des gels contenant 15% d'acrylamide et les protéines marquées au ³²P ont été révélées par autoradiographie sur film Biomax XAR (Kodak) tel que décrit précédemment (298). L'absence d'une bande correspondant à HPr(Ser-³²P) lors des essais de phosphorylation fait en présence de HprK/P ainsi que la présence d'une bande correspondant à HPr(His-³²P) lors des essais de phosphorylation fait en présence de EI nous ont permis de conclure que la préparation de PEP[³²P] était exempte d'ATP[³²P].

2.5 Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr

Que ce soit par immunoelectrophorèse croisée ou par immunobuvardage, la détermination quantitative des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr a été effectuée sur

des cultures préparées tel que décrit à la section 2.2 avec quelques modifications. De façon générale, les bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance ont été cultivées en présence de 0,4% glucose ou mélibiose à l'exception de *S. suis* qui a été cultivée en présence de 0,2% glucose. Les cultures récoltées en phase stationnaire de croissance ont été effectuées en présence de 0,2% glucose ou mélibiose. Dans le but d'inactiver les enzymes responsables de la dégradation des différentes formes de HPr, le milieu intracellulaire devait être rapidement acidifié. Pour ce faire, l'inhibition de la croissance des différentes souches employées a d'abord été vérifiée par l'addition de l'un ou l'autre des ionophores suivant: gramicidine D (1 μ M), gramicidine S (1 et 5 μ M), nigéricine (1 μ M), valinomycine (1 μ M), carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP) (10 μ M) et 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone (FCCP) (10 μ M) à des cultures en phase exponentielle de croissance. Suite à ces vérifications, la croissance cellulaire a été arrêtée par l'ajout de chloramphénicol à 50 μ g/ml et de gramicidine D à 1 μ M. Le milieu de culture était ensuite rapidement acidifié à pH 4,5 avec du HCl 10 M. Les cellules ont été lysées comme décrit à la section 2.2 et les extraits solubles ont été obtenus suite à une centrifugation de 90 min ou de 16 h des extraits cellulaires à 200 000 \times g à 4°C et ont été utilisés immédiatement.

2.5.1 Immunoélectrophorèse croisée

Les niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr ont été déterminés par immunoélectrophorèse croisée à l'aide d'anticorps dirigés contre les HPr de *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. aureus* ou *B. subtilis* tel que décrit préalablement (369). Les anticorps dirigés contre le HPr de *S. salivarius* ont été employés contre les extraits cellulaires de *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. bovis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. casei* et *L. lactis* ssp. *lactis*. Les anticorps dirigés contre le HPr de *S. mutans* ont été employés contre les extraits cellulaires de *S. pneumoniae*, *S. suis*, *E. faecalis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. casei* et *L. lactis* ssp. *cremoris*. Les anticorps dirigés contre le HPr de *B. subtilis* ont été employés contre les extraits cellulaires de *B. subtilis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *L. casei* alors que ceux dirigés contre *S. aureus* ont servi contre les extraits de *S. aureus*. Une courbe étalon a été obtenue à l'aide de HPr purifiée de *S. salivarius*.

Dans un premier temps, 5 à 10 μg d'extraits protéiques solubles ont été déposés sur un gel d'agarose 1% fixé à une plaque de verre. Les protéines ont ensuite été soumises à une première électrophorèse à 10 V/cm pour une période de 1 h. Après cette première séparation, le gel d'agarose a été découpé puis déposé perpendiculairement sur une deuxième plaque de verre (Fig. 20). Une solution de 10 ml d'agarose additionnée de 300 à 600 μl d'anticorps a été employée pour couvrir le reste de la plaque de verre qui a servi de support au deuxième gel. Un courant de 2 V/cm a été appliqué et la durée de la deuxième électrophorèse a été de 18 h. Toutes les immunoelectrophorèses ont été effectuées à 10°C. Afin d'être en mesure de révéler uniquement les protéines immunoprécipitées, les protéines contaminantes ont été retirées du gels d'agarose selon la méthode suivante. Les gels d'agarose ont été lavés puis pressés à trois reprises dans une solution saline (100 mM de NaCl), puis une fois supplémentaire dans de l'eau distillée. Les gels ont ensuite été séchés directement sur leur support de verre et les arcs d'immunoprécipitation ont été révélés en trempant les gels 10 min dans une solution de bleu de Coomassie (50% (v/v) de méthanol, 10% (v/v) d'acide acétique et 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie R250). La surface sous les pics a été déterminée à l'aide du programme informatique Image Master 2D, version 2002.01 (Amersham Bioscience).

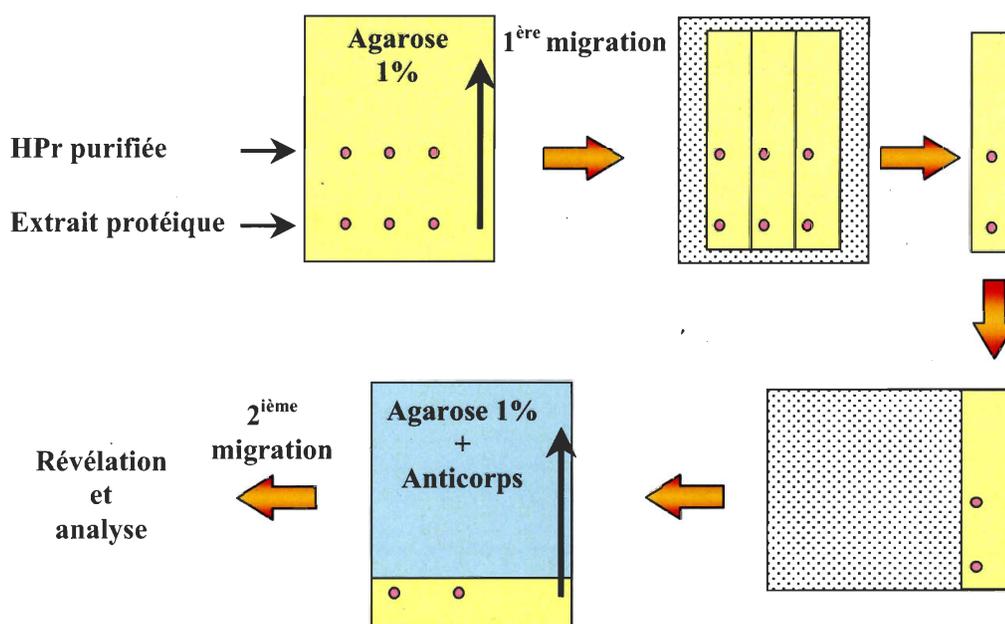


Figure 20 : Représentation schématique des étapes clés de l'immunoelectrophorèse croisée.

2.5.2 Immunobuvardage de type Western

Les protéines (5, 10 et/ou 15 µg) des extraits cellulaires ont d'abord été séparées à température ambiante par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition non dénaturante (PAGE) tel que décrit préalablement (298) en employant un appareil Mini-Protean II (Bio-Rad). La durée de l'électrophorèse était approximativement de 45 min. Les protéines ont ensuite été transférées électrophorétiquement sur une membrane de nitrocellulose (pore de 0,22 µm) tel que décrit préalablement (362). Suite au transfert, la membrane de nitrocellulose a été rincée 10 min avec du tampon TBS (20 mM de Tris, 500 mM de NaCl (pH 7,5)), incubée 1 h avec du tampon TBS contenant 5% de lait écrémé afin de bloquer les sites non occupés puis lavée à deux reprises avec du tampon TTBS (TBS contenant 0,05% de Tween 20) pendant 5 min. La membrane était ensuite incubée 2 h en présence des solutions d'antisérums diluées avec du tampon TTBS contenant 2% de lait écrémé, rincée à l'eau déionisée, immergée à deux reprises dans du tampon TTBS pendant 15 min et incubée 1 h en présence d'immunoglobulines G (IgG) anti-lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Sigma) diluée 1:30 000 dans du tampon TTBS contenant 2% de lait écrémé. La membrane était ensuite rincée à l'eau déionisée, immergée à deux reprises dans du tampon TTBS pendant 15 min, et une troisième fois dans du tampon TBS pendant 5 min. Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés suite à une exposition à 15 mg de NBT et 7,5 mg de BCIP dilués dans 50 ml de tampon carbonate 100 mM (pH 9,8) contenant 1 mM de MgCl₂. Les résultats ont été analysés à l'aide du programme informatique Image Master 2D, version 2002.01 (Amersham Bioscience).

2.6 Production d'anticorps

Les antisérums dirigés contre les protéines HPr de *S. salivarius*, *S. mutans* et *S. aureus* et contre les protéines EI et CcpA de *S. salivarius* ont été obtenus de lapins femelles de Nouvelle-Zélande tel que décrit préalablement (353). Brièvement, lors de l'immunisation primaire des lapins, 200 µl d'une solution composée de 150 µg d'antigènes dilués dans 0,5 ml de PBS à laquelle était ajouté 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund ont été injectés à cinq sites. Après quatre semaines, temps nécessaire au développement d'une réponse immunitaire, une deuxième immunisation a été effectuée de la même façon que la première à l'exception que les solutions protéiques ont été mélangées à de l'adjuvant incomplet de Freund. Trois à quatre

semaines suivant le rappel, les lapins ont été sacrifiés par exsanguination. Les antisérums ont été récupérés, aliquotés, puis congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les antisérums de lapin dirigés contre le HPr de *B. subtilis* ont été fournis gracieusement par le Dr Josef Deutscher (INRA, France).

2.7 Purification et manipulation de l'ADN

L'ADN chromosomique a été isolé des streptocoques selon la méthode décrite par Gauthier *et al.* (108). Sauf indications contraires, les manipulations de l'ADN ont été effectuées selon des procédures standards (25). Les cellules électrocompétentes de *E. coli* BL21(DE3) et *E. coli* XL1-blue ont été transformées avec de l'ADN plasmidique par électroporation (319). Les fragments d'ADN utilisés pour le séquençage ou clonage ont été récupérés en employant la trousse de purification QIAquick (Qiagen). Les amplifications en chaîne par polymérase (PCR) ont été faites à l'aide de l'appareil DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer). Le mélange réactionnel, d'un volume de 50 à 100 μl , était composé de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl_2 , 1 μg d'ADN chromosomique ou plasmidique, 0,2 μM d'amorces et de 100 μM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphates. Les réactions comprenaient de 30 à 40 cycles d'amplification en présence de 1 U de Vent polymérase ou de *Taq* polymérase selon que l'amplicon désiré était destiné à être cloné ou non. Les profils de température/durée des cycles des différents PCR, optimisés en fonction de la polymérase employée, des amorces employées et de la longueur de l'amplicon désirée, sont rapportés au Tableau 3. Les séquences nucléotidiques de l'opéron *pts*, et du gène *ccpA* de *S. salivarius* ATCC 25975 et G71, ainsi que celles des amplicons utilisés lors de clonage ont été déterminées par le service de séquençage de l'Université Laval.

Tableau 3 : Conditions des amplifications en chaîne par polymérase

Couple d'amorces	Gène ou opéron cible	Dénaturation	Hybridation	Élongation	# cycle
<i>manH</i> 53F et <i>manH</i> 1070R	<i>manH</i> de <i>S. salivarius</i>	60 s / 95°C	60 s / 47°C	60 s / 72°C	30
<i>ccpathe</i> 180 et <i>ccpathe</i> 1609R	<i>ccpA</i> de <i>S. salivarius</i>	60 s / 94°C	60 s / 48°C	90 s / 72°C	30
<i>pbadF</i> et <i>pbadR</i>	<i>ptsH</i> de <i>S. salivarius</i> (sur le plasmide pBAD)	45 s / 94°C	45 s / 38°C	90 s / 72°C	40
<i>ptsH</i> 1C et <i>ptsI</i> 32R	<i>ptsH</i> de <i>S. salivarius</i> G71	45 s / 94°C	45 s / 42°C	90 s / 72°C	35
<i>ptsH</i> 397C et <i>ptsI</i> 668R	<i>ptsI</i> de <i>S. salivarius</i> G71	45 s / 94°C	45 s / 42°C	90 s / 72°C	35

2.8 Clonage du gène *manH*

Le gène *manH* de *S. salivarius*, codant pour la protéine IIAB_H^{Man}, a été amplifié par PCR avec les amorces manH53F (5'-GGAAGAACACCATATGGGGTATCGGTATTAT-3') et manH1071R (5'-AACTCATTTATGCATCCTCGAGAATTA-3'). En plus de permettre l'amplification du gène *manH*, la première amorce insérait un site de restriction CATATG alors que la seconde insérait le site CTCGAG. L'amplicon obtenu a été digéré à 37°C avec les enzymes de restriction NdeI et XhoI, clivant respectivement les séquences CATATG et CTCGAG, puis inséré, par clonage, dans le plasmide d'expression pET-19b (Novagen) préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide obtenu, pDR3, a été, dans un premier temps, introduit par électroporation dans *E. coli* XL1-blue. Le plasmide pDR3 a ensuite été isolé à partir d'une culture de 10 ml de *E. coli* XL1-blue à l'aide de la trousse de purification de plasmide mini-prep (Qiagen). L'intégrité de la séquence du gène *manH* du plasmide pDR3 a été confirmée suite à la détermination de la séquence nucléotidique des deux brins d'ADN. Finalement, pDR3 a été introduit par électroporation dans la souche *E. coli* BL21(DE3).

2.9 Purification de protéines

2.9.1 Purification de HPr de *S. aureus*

La protéine HPr de *S. aureus* a été purifiée à partir de la souche ATCC 6538 tel que décrit par Kalbitzer *et al.* (174) avec les modifications suivantes. La fraction soluble des extraits cellulaires a été préparée tel que décrit à la section 2.2 et récupérée après une centrifugation à 4°C de 16 h à 200 000 × g. Les protéines de la fraction soluble ont été séparées par chromatographie sur un échangeur d'anions en utilisant une colonne mono Q 5/50 GL (Amersham Biosciences). Après élution avec un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), un gradient de 0 à 250 mM de NaCl dans du tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) a été appliqué. Les fractions ont été récoltées et HPr a été localisée à l'aide d'un essai de phosphorylation par la HprK/P aux dépens de l'ATP marqué au ³²P. Le mélange réactionnel était composé de 10 mM de HEPES (pH 7,5), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de dithiothréitol (DTT), 1 μM de HprK/P et 2 mM d'ATP à 25 μCi/μmol. Les fractions contenant HPr ont été regroupées, acidifiées à pH 5,0 avec du HCl 100 mM, et chauffées à 65°C pendant 5 min. Le précipité

ainsi obtenu a été retiré par centrifugation à 4°C (13 000 × g pour 10 min). Ensuite, le pH a été ajusté à 7,5 par l'addition de NaOH 100 mM et le surnageant a été concentré à l'aide d'une unité de filtration « *Amicon microcentrifuge ultrafree-MC filter unit* » (limite nominale de masse moléculaire : 5 000 Da) (Millipore). La fraction concentrée a enfin été purifiée par filtration sur un gel en utilisant une colonne de Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) et éluée avec du tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5). La pureté de HPr a été vérifiée par SDS-PAGE et l'identité de la protéine a été confirmée par détermination de la séquence de peptides par LC/MS/MS (voir section 2.19, page 69). La fraction de HPr de *S. aureus* ainsi purifiée a servi à la production d'anticorps tel que décrit à la section 2.6.

2.9.2 Purification des protéines recombinantes de *S. salivarius* et *B. subtilis*

Les protéines recombinantes de *S. salivarius* His₆-HPr, His₆-HPr(S46D), His₆-EI, His₆-HprK/P, His₁₀-IIAB_L^{Man} et His₁₀-IIAB_H^{Man} ont été purifiées à partir des souches *E. coli* LMG194 portant les plasmides pHPW18 et pH46D et *E. coli* BL21(DE3) portant les plasmides pETI-16, pHPKHis, pTML2 et pDR3 respectivement tel que décrit (48, 202). La protéine recombinante His₆-HPr de *B. subtilis* a été purifiée à partir de la souche de *E. coli* NM522 portant le plasmide pAG2 tel que décrit préalablement (48). Brièvement, les cultures cellulaires, contenant les antibiotiques appropriés (voir Tableau 2, page 50), de *E. coli* LMG194 (pHPW18 ou pH46D) ont été additionnées de 0,02% de L-arabinose alors que les cultures de *E. coli* NM522 (pAG2) et *E. coli* BL21(DE3) (pETI-16, pHPKHis, pTML2 ou pDR3) ont été additionnées de 1 mM de IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) lorsque les densités optiques des cultures à 600 nm se situaient entre 0,4 et 0,7 afin d'induire la surproduction de HPr et HPr(S46D) de *S. salivarius* ainsi que HPr de *B. subtilis* respectivement. Après une induction de 16 h pour la souche LMG194 et de 4 h pour les souches NM522 et BL21(DE3), les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4°C (20 000 × g pendant 10 min). Les cellules ont été remises en suspension dans 30 ml de tampon composé de 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de NaCl et 10% (v/v) de glycérol. Les suspensions étaient additionnées de 0,5 mg/ml de lysozyme (Sigma-Aldrich) et 1 mg d'ADNase I (Roche Applied Science), puis incubées à 4°C pendant 2 h. Les suspensions cellulaires ont ensuite été traitées aux ultrasons (4 × 30 s)

sur glace à l'aide de l'appareil Sonifier Cell Disruptor W-350 (Heat Systems Ultrasonics) en mode pulsation, l'intensité réglée à 5 et les cycles réglés à 50%. Les extraits cellulaires ont été centrifugés 60 min à 4°C (20 000 × g). Les surnageants ont été centrifugés de nouveau à 4°C pour 90 min à 100 000 × g et ensuite dialysés contre du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 300 mM de NaCl. Les dialysats ont été déposés sur des colonnes d'affinité Ni²⁺-Sepharose HP (Amersham Biosciences) préalablement équilibrées avec dix volumes de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 300 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole. Les colonnes ont été lavées avec dix volumes de ce même tampon contenant 20 mM d'imidazole et les protéines recombinantes ont été éluées avec cinq volumes de tampon d'équilibration contenant 250 mM d'imidazole. Dans le cas de la HprK/P, les fractions ont été dialysées 16 h à 4°C contre du tampon Tris-acétate 50 mM (pH 7,5) contenant 10% (v/v) de glycérol, 0,1 mM de PMSF, 2 µM de pepstatine A, 2 µM de leupeptine et 1 mM de EDTA puis conservées à -80°C. Les fractions contenant les autres protéines recombinantes ont été concentrées par ultracentrifugation sur des membranes NanoSep 3K (Pall). Les fractions concentrées ont été purifiées par filtration sur gel en utilisant une colonne de Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) dans le cas des protéines HPr et IIAB^{Man}, ou une colonne de Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences) dans le cas de EI, et éluées avec du tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5). Les fractions purifiées ont finalement été concentrées à nouveau par ultracentrifugation sur des membranes NanoSep 3K (Pall). Du glycérol, à une concentration finale de 10% (v/v), a été ajouté aux fractions concentrées qui ont été conservées à -80°C.

2.9.3 Purification des protéines recombinantes de *E. casseliflavus*

Les protéines recombinantes HPr et glycérol kinase (GlpK) de *E. casseliflavus* ont été purifiées à partir de la souche *E. coli* NM522 portant les plasmides pTSHEc et pQEglpKEcas, respectivement. Le même protocole de purification a été utilisé dans les deux cas. Dans un premier temps, les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle tardive (DO₆₆₀=0,6) dans du milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 µg/ml. L'expression de la GlpK a été induite par l'addition de 1 mM d'IPTG selon les directives du manufacturier (Novagen). Les cellules ont été récupérées par centrifugation (20 min à 20 000 × g) puis resuspendues dans une solution de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant

300 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA, 2 μ M de pepstatine, 2 μ M de leupeptine, 100 μ M de PMSF et du lysozyme à 1 mg/ml. Après 2 h à 4°C, les cellules ont été lysées aux ultrasons (4 \times 30 s) sur glace à l'aide de l'appareil Sonifier Cell Disruptor W-350 (Heat Systems Ultrasonics) en mode pulsation, l'intensité réglée à 5 et les cycles réglés à 50%. L'extrait cellulaire a été centrifugé 60 min à 4°C (20 000 \times g). Le surnageant a été centrifugé de nouveau à 4°C pendant 90 min à 100 000 \times g et ensuite dialysé contre du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 300 mM de NaCl. Le dialysat a été déposé sur une colonne d'affinité Ni²⁺-Sephacrose HP (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec dix volumes de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 300 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole. La colonne a été lavée avec dix volumes de ce même tampon contenant 20 mM d'imidazole et la protéine recombinante a été éluée avec cinq volumes de tampon d'équilibration contenant 250 mM d'imidazole. Les analyses par SDS-PAGE ont révélé que les protéines étaient pures à plus de 95%. La concentration de la GlpK recombinante de *E. casseliflavus* a été déterminée par spectrophotométrie ($\epsilon_{280\text{nm}} = 90\,040\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Le coefficient d'extinction molaire de la GlpK a été déterminé à partir de la séquence en acides aminés de la protéine recombinante. La concentration de la protéine His₆-HPr de *E. casseliflavus* a été déterminée suite à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au bleu de Coomassie en utilisant comme référence une courbe étalon de His₆-HPr purifiée de *S. salivarius* et dont la concentration avait été établie préalablement par spectrophotométrie comme décrit à la section 2.11. La détermination de l'intensité de la coloration des bandes protéiques ainsi que la comparaison de ses dernières ont été effectuées à l'aide du programme Image Master 2D, version 2002.01 (Amersham Biosciences).

2.10 Caractérisation des enzymes recombinantes IIAB^{Man}

Les enzymes II du PTS sont phosphorylées réversiblement par HPr(His~P) et transfèrent leur groupement phosphorylé à des molécules de sucre. Afin de vérifier que la présence d'une queue d'histidine en position N-terminale n'interférait pas avec ces fonctions, des essais de phosphorylation des IIAB^{Man} par HPr et de phosphorylation de HPr par IIAB^{Man}~P ont été réalisés. Dans un premier temps, les réactions de phosphorylation de 10 μ M de His₁₀-IIAB_L^{Man} et de 10 μ M His₁₀-IIAB_H^{Man} par His₆-HPr(His~P) ont été

réalisées dans du tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 1 mM de DTT, 5 mM de $MgCl_2$, 2 μM de His₆-EI, 5 μM de His₆-HPr et 1 mM de PEP[³²P] (15 $\mu Ci/\mu mol$) pendant 15 min à température ambiante. Les réactions de phosphorylation de His₆-HPr par His₁₀-IIAB_L^{Man}~P et His₁₀-IIAB_H^{Man}~P ont été réalisées en deux temps. Les enzymes His₁₀-IIAB_L^{Man} à 20 μM et His₁₀-IIAB_H^{Man} à 20 μM ont d'abord été phosphorylées dans du tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 1 mM de DTT, 5 mM de $MgCl_2$, 2 μM de EI, 5 μM de HPr et 1 mM de PEP[³²P] (15 $\mu Ci/\mu mol$) pendant 15 min à température ambiante. Les mélanges réactionnels ont ensuite été déposés sur des colonnes d'affinité Ni²⁺-Sepharose HP (Amersham Biosciences) préalablement équilibrées avec dix volumes de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contenant 300 mM de NaCl et 10 mM d'imidazole. Les colonnes ont été lavées avec dix volumes de ce même tampon contenant 20 mM d'imidazole et les protéines recombinantes ont été éluées avec cinq volumes de tampon d'équilibration contenant 250 mM d'imidazole. Les enzymes His₁₀-IIAB_L^{Man}~P et His₁₀-IIAB_H^{Man}~P, à une concentration finale de 10 μM , ont finalement été séparément mises en présence de 5 μM de His₆-HPr pendant 15 min à température ambiante. Les réactions ont été arrêtées par l'addition d'un volume égal de tampon Tris-HCl 180 mM (pH 6,8) contenant 200 mM de SDS, 30% de glycérol, 2 M de β -mercaptoéthanol et 0,003% de bleu de bromophénol. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE en utilisant des gels contenant 12% d'acrylamide et les protéines marquées au ³²P ont été révélées par autoradiographie en utilisant un film Biomax XAR (Kodak) tel que décrit précédemment (56, 298).

Afin de vérifier si les protéines IIAB^{Man} recombinantes étaient en mesure de phosphoryler leurs sucres substrats, des essais de phosphorylation du mannose ont été effectués tel que décrit à la section 2.17 avec les changements suivants. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 600 μl de tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT, 1 μM de His₆-EI, 20 unités de LDH (muscle de lapin, Sigma-Aldrich), 50 μM de HPr, 11 mM de mannose, 150 μM de NADH, 10 mM de PEP et 100 μg d'extrait membranaire de *S. salivarius* α -S3L11, une souche dépourvue d'activité IIAB^{Man} (371). Les milieux réactionnels ont été incubés 5 min à 37°C avant l'addition de 0,5 à 10 μM de IIAB_L^{Man} ou de IIAB_H^{Man} afin d'initier les réactions. Celles-ci ont été suivies à 340 nm à

l'aide d'un spectrophotomètre DU530 (Beckman) pendant 10 min avec des lectures d'absorbance à toutes les cinq secondes. Les activités des EII ont été calculées à partir du ΔA_{340} résultant de la conversion du NADH en NAD^+ ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

2.11 Vérification des activités de HprK/P de *B. subtilis*

L'activité kinase de la HprK/P de *B. subtilis* a été mesurée à pH 7,5 et 4,5. Les réactions ont été effectuées dans des volumes totaux de 100 μl contenant 50 mM de tampon HEPES (pH 7,5) ou 50 mM de tampon acétate (pH 4,5) additionnés de 10 μg de HPr, 1 mM d'ATP, 5 mM de FBP, 5 mM de MgCl_2 , 12 mM de NaF et 130 μg d'extrait membranaire de *B. subtilis* préparé selon la méthode décrite à la section 2.2. L'activité phosphorylase de la HprK/P de *B. subtilis* a été mesurée à pH 7,5 et 4,5. Les réactions ont été effectuées dans des volumes totaux de 100 μl contenant 50 mM de tampon phosphate (pH 7,5) ou 50 mM d'une solution de phosphate (Na^+ , pH 4,5) additionnées de 10 μg de HPr(Ser-P), 20 mM de MgCl_2 et 130 μg d'extrait membranaire de *B. subtilis* préparé selon la méthode décrite à la section 2.2. Les milieux réactionnels ont été incubés à 37°C pendant 2 h. Des échantillons de chaque mélange réactionnel ont été fractionnés par immunoélectrophorèse croisée et les différentes formes de HPr ont été révélées selon la méthode décrite à la section 2.5.1.

2.12 Synthèse de His₆-HPr(Ser-P)

La synthèse de His₆-HPr(Ser-P) à partir des His₆-HPr de *S. salivarius* et *E. casseliflavus* a été effectuée à l'aide de l'enzyme recombinante His₆-HprK/P (0,25 μM) de *S. salivarius* (44) et de 25 μM des His₆-HPr. L'enzyme et son substrat ont été incubés 60 min à 37°C dans un tampon Tris-acétate 50 mM (pH 7,5) contenant 2 mM d'ATP et 5 mM de MgCl_2 . Le produit de la réaction, His₆-HPr(Ser-P), a été purifié sur une colonne d'affinité Ni^{2+} -Sepharose HP (Amersham Biosciences) et par chromatographie sur une colonne de Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec du tampon HEPES 25 mM (pH 7,5) tel que décrit précédemment (48). La pureté des His₆-HPr(Ser-P) a été vérifiée par PAGE en conditions non dénaturantes (298). La concentration du His₆-HPr(Ser-P) de *S. salivarius* a été déterminée par spectrophotométrie ($\epsilon_{280\text{nm}} = 3\,475\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Le coefficient d'extinction molaire de HPr a été déterminé par Casabon *et al.* (48) en mesurant la concentration d'une préparation pure de His₆-HPr en

utilisant l'essai couplé à la lactate déshydrogénase décrit par Waygood *et al.* (392) avec les modifications suivantes: la réaction a été effectuée à 37°C dans un volume total de 600 µl contenant 0,25 µM de EI, 150 mM de KCl, 10 mM de PEP, 1 mM de DTT, et 20 unités de lactate déshydrogénase (LDH) de muscle de lapin (Sigma-Aldrich) (48). La concentration du His₆-HPr(Ser-P) de *E. casseliflavus* a été évaluée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au bleu de Coomassie en employant une courbe étalon de His₆-HPr purifiée de *S. salivarius*. La détermination de l'intensité de la coloration des bandes protéiques ainsi que la comparaison de ces intensités ont été effectuées à l'aide du programme Image Master 2D, version 2002.01 (Amersham Biosciences).

2.13 Phosphorylation de His₁₀-IIAB_L^{Man} et His₁₀-IIAB_H^{Man} par His₆-HPr(His~³²P), His₆-HPr(Ser-P)(His~³²P) et His₆-HPr(S46D)(His~³²P)

Les réactions de phosphorylation de His₁₀-IIAB_L^{Man} et His₁₀-IIAB_H^{Man} par His₆-HPr(His~P) ont été réalisées dans du tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 1 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂, 2 µM de His₆-EI, 5 µM de His₆-HPr et 1 mM de PEP[³²P] (15 µCi/µmol). Les réactions de phosphorylation de His₁₀-IIAB_L^{Man} et His₁₀-IIAB_H^{Man} par His₆-HPr(Ser-P)(His~P) ou His₆-HPr(S46D)(His~P) ont été accomplies sous les mêmes conditions sauf pour les concentrations de His₆-HPr(Ser-P) et de His₆-HPr(S46D) qui étaient de 13,4 µM et de 12,6 µM respectivement. Après une première incubation de 45 min à 37°C servant à produire HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P), les solutions ont été incubées pendant 5 min additionnelles à 10°C ou 4°C de façon à ce que les mélanges réactionnels soient aux températures requises. Les enzymes IIAB_H^{Man} ou IIAB_L^{Man} ont ensuite été ajoutées aux milieux réactionnels à une concentration finale de 10 µM. Afin de suivre la vitesse de transfert des groupements phosphorylés des HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P) aux IIAB^{Man}, des échantillons ont été recueillis à intervalles réguliers (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 180 s) et la réaction a été arrêtée par l'addition d'un volume égal de tampon Tris-HCl 180 mM (pH 6,8) contenant 200 mM de SDS, 30% de glycérol, 2 M de β-mercaptoéthanol et 0,003% de bleu de bromophénol. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE en utilisant des gels contenant 12% d'acrylamide et les protéines marquées au ³²P ont été révélées suite à une exposition à un appareil de type Phosphorimager (plaque Fuji imaging de l'appareil bio-imaging analyzer, type BAS-IIIS)

ou par autoradiographie en utilisant un film Biomax XAR (Kodak) tel que décrit précédemment (56, 298). La quantité de phospho-IIAB^{Man} a été déterminée par l'excision de portions de gel contenant les enzymes $^{32}\text{P}\sim\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}$ et $^{32}\text{P}\sim\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}$. La radioactivité contenu dans les portions de gel prélevées a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (LS 6500 multi-purpose scintillation counter, Beckman Coulter) après avoir déposé les morceaux de gel dans des fioles à scintillation contenant 5 ml de Cytosint ES (ICN).

2.14 Phosphorylation de His₁₀-IIAB_L^{Man} et His₁₀-IIAB_H^{Man} par His₆-HPr(His~P) et His₆-HPr(Ser-P)(His~P), mesurée par spectrophotométrie

Les vitesses de phosphorylation des enzymes IIAB^{Man} de *S. salivarius* ont été mesurées à l'aide d'un essai spectrophotométrique couplé faisant intervenir les enzymes EI et LDH (Fig. 21) décrit à l'origine par Waygood *et al.* (392, 394) et modifié par Casabon *et al.* (48) avec les changements suivants. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 600 µl de tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 µM de His₆-EI, 20 unités de LDH (muscle de lapin, Sigma-Aldrich), 50 nM à 1 000 nM de HPr et 20 µM de IIAB_L^{Man}. Les milieux réactionnels ont été incubés 15 min à 4°C avant l'addition de 100 µM de NADH et 10 mM de PEP afin d'initier les réactions. Celles-ci ont été suivies à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 3 à 340 nm pendant 5 min avec des lectures d'absorbance aux dixièmes de seconde. Les vitesses de phosphorylation des deux enzymes IIAB^{Man} ont été calculées à partir du ΔA_{340} résultant de la conversion du NADH en NAD⁺ ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

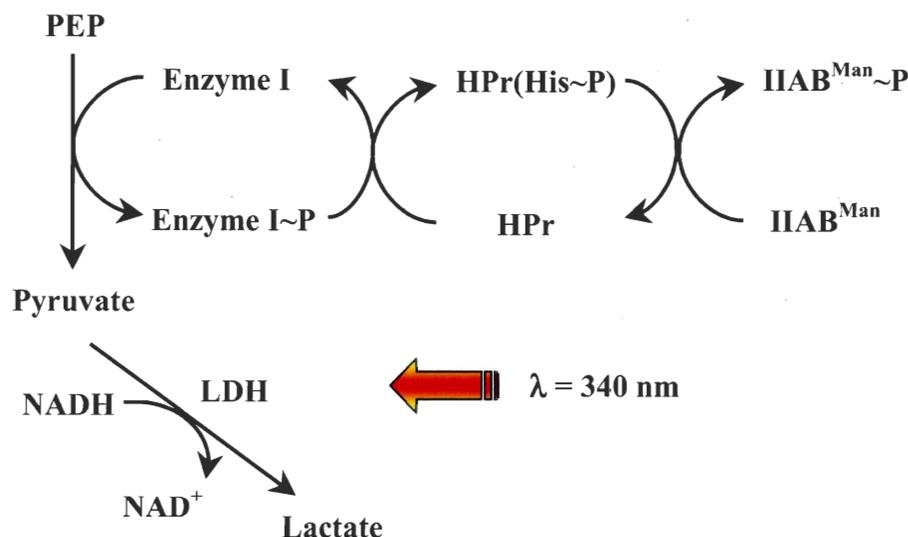


Figure 21 : Phosphorylation des enzymes IIAB^{Man} via la réaction couplée EI-LDH.

2.15 Phosphorylation de His₆-GlpK de *E. casseliflavus* par His₆-HPr(His~³²P) et His₆-HPr(Ser-P)(His~³²P) de *S. salivarius*, *B. subtilis* et *E. casseliflavus*

Les essais de phosphorylation de l'enzyme recombinante His₆-GlpK par HPr(His~P) de *S. salivarius*, *B. subtilis* et de *E. casseliflavus* ont été réalisés dans un tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 1 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂, 1 μ M de His₆-EI, 10 μ M de His₆-HPr et 500 μ M de PEP[³²P] (30 μ Ci/ μ mol). Les essais de phosphorylation de l'enzyme recombinante His₆-GlpK par HPr(Ser-P)(His~P) de *S. salivarius* et de *E. casseliflavus* ont été réalisés sous les mêmes conditions mais en utilisant 20 μ M de His₆-HPr(Ser-P). Après une incubation de 45 min à 37°C, 30 μ M de GlpK ont été ajoutés au mélange réactionnel. La réaction de phosphorylation a été arrêtée par l'addition d'un volume égal d'une solution contenant 180 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM de SDS, 30% (v/v) de glycérol, 2 M de β -mercaptoéthanol et 0,003% (p/v) de bleu de bromophénol. Les protéines ont ensuite été séparées par SDS-PAGE en utilisant des gels contenant 12% d'acrylamide. Les protéines marquées au ³²P ont été détectées par autoradiographie en utilisant un film Biomax XAR (Kodak) tel que décrit précédemment (298).

2.16 Dosage protéique

Les protéines des divers extraits cellulaires ont été dosées avec la trousse commerciale « D_c protein assay » (Bio-Rad) selon les recommandations du manufacturier. Pour chaque dosage, une courbe étalon, couvrant les concentrations de 0,2 à 1,5 mg/ml de protéine, a été faite à partir d'une solution de BSA à 2 mg/ml (Sigma).

2.17 Dosage de l'activité EII-maltose et EII-glucose de *S. salivarius*, mesurée par spectrophotométrie

Les activités EII-maltose et EII-glucose, c'est à dire leur capacité de transférer un groupement phosphoryle au maltose ou au glucose, ont été mesurées à l'aide de l'essai spectrophotométrique couplé faisant intervenir les enzymes EI et LDH décrit à la section 2.14 avec les changements suivants. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 600 µl de tampon HEPES 50 mM (pH 7,5) contenant 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 µM de His₆-EI, 20 unités de LDH (muscle de lapin, Sigma-Aldrich), 50 µM de HPr, 150 µM de NADH, 10 mM de PEP et 10 µg à 20 µg d'extrait membranaire de *S. salivarius* A37 cultivée en présence de maltose ou de galactose. Les milieux réactionnels ont été incubés 5 min à 37°C avant l'addition de 11 mM de glucose ou 11 mM de maltose afin d'initier les réactions. Celles-ci ont été suivies à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre DU530 (Beckman) pendant 10 min avec des lectures d'absorbance à toutes les cinq secondes. Les activités des EII ont été calculées à partir du ΔA_{340} résultant de la conversion du NADH en NAD⁺.

2.18 Électrophorèse sur gel à deux dimensions

Les fractions solubles et membranaires des extraits cellulaires de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 (voir Tableau 2, page 50) ont été dialysées à 4°C sous agitation constante à l'aide de membrane à dialyse Spectra/Por (limite de masse moléculaire nominale : 6 000 à 8 000) pour une durée variant de 16 à 18 h contre un tampon HEPES 1 mM (pH 7,5). En vue d'effectuer la première séparation, consistant en une focalisation isoélectrique, les protéines des échantillons ont été précipitées par l'addition d'acétone. Ainsi, cinq volumes d'acétone froid (-20°C) ont été ajoutés à un volume d'extrait cellulaire. Après avoir laissé

précipiter 3 h à -20°C , les échantillons ont été centrifugés 10 min à $10\,000 \times g$. Le culot cellulaire a été resuspendu à raison de $200\ \mu\text{g}$ de protéines par ml et maintenu 2 h à la température ambiante dans un tampon de réhydratation standard contenant $9,5\ \text{M}$ d'urée, 8% (p/v) de CHAPS, $20\ \text{mM}$ de DTT et $0,5\%$ (v/v) d'ampholytes IPG (*immobilized pH gradient*) couvrant un étendu de pH allant de $4,0$ à $7,0$. Les échantillons ($450\ \mu\text{l}$) ont été déposés sur des languettes IPG (pH 4-7) ayant une étendue de séparation de $24\ \text{cm}$. Dans un premier temps, les languettes, sur lesquelles les échantillons avaient d'abord été déposés, ont été réhydratées pendant $12\ \text{h}$ à 20°C . Ensuite, à l'aide de l'instrument IPGphor (Amersham Biosciences), la focalisation isoélectrique des protéines présentes sur les languettes réhydratées a été effectuée en appliquant de façon séquentielle les voltages suivants : $500\ \text{V}$ pendant $1\ \text{h}$, $1\,000\ \text{V}$ pendant $1\ \text{h}$, et $8\,000\ \text{V}$ pendant $8:20\ \text{h}$. Le courant a été limité à $50\ \mu\text{A}$ par languette IPG. Les languettes ont ensuite été conservées à -80°C ou ont été employées immédiatement pour effectuer la seconde séparation électrophorétique. Les languettes IPG ont d'abord été équilibrées $15\ \text{min}$ dans la solution [1] constituée de $7,2\ \text{M}$ d'urée, $50\ \text{mM}$ de Tris-HCl (pH 8,8), 2% (p/v) de SDS, 36% (v/v) de glycérol et 1% (p/v) de DTT, puis équilibrées pendant $15\ \text{min}$ dans la solution [2] constituée de $7,2\ \text{M}$ d'urée, $50\ \text{mM}$ de Tris-HCl (pH 8,8), 2% (p/v) de SDS, 36% (v/v) de glycérol et $2,5\%$ (p/v) de iodoacétamide. Enfin, les languettes ont été déposées à la surface d'un gel de polyacrylamide 12% contenant du SDS à $0,1\%$ et scellées à l'aide d'agarose $0,5\%$ dissous dans le tampon d'électrophorèse constitué de $0,1\%$ (p/v) de SDS, $25\ \text{mM}$ de Tris et $0,192\ \text{M}$ de glycine. La séparation des protéines en fonction de leur taille a été effectuée à 17°C avec l'unité d'électrophorèse Ettan Dalt 6 (Amersham Biosciences) selon la routine suivante : $30\ \text{min}$ à $5\ \text{W}$ par gel, $3-4\ \text{h}$ à $17\ \text{W}$ par gel. Les protéines ont été détectées par coloration au nitrate d'argent tel que décrit précédemment (251). Les gels ont été numérisés (Imagescanner, Amersham Biosciences) et les images obtenues ont été analysées en utilisant le programme Image master 2D, version 2002.01 (Amersham Biosciences). Au minimum, trois extraits ont été analysés en triplicata pour chacune des conditions étudiées. Dans un premier temps, l'ensemble des protéines présentes sur les images des gels numérisés ont été identifiées. Ensuite, les différentes protéines identifiées sur les différentes images étaient rapportées sur une image maîtresse. Cette image maîtresse devenait alors le point de référence pour toutes les images de gels numérisés ce qui permettait, par la suite,

de corrélérer les protéines présentes sur un gel à celles identifiées sur un autre gel. Afin de corriger les différences d'intensité dans la coloration des protéines pouvant être associées à une période de révélation plus ou moins longue lors de la coloration au nitrate d'argent, l'intensité totale de toutes les protéines présentes sur une image de gel était normalisée à 100. Les données des images issues d'un même microorganisme ont été fusionnées. Pour que les données soient conservées sur le gel moyen ainsi obtenu, les protéines s'y rapportant devaient être présentes sur un minimum de deux images sur trois. Les protéines sur- ou sous exprimés par un facteur d'au moins deux et présentant un écart-type inférieur à 30% ont été retenues pour la suite de l'étude.

2.19 Détermination de la séquence de peptides par LC/MS/MS

Après les électrophorèses en deux dimensions, des morceaux de gels contenant les protéines d'intérêt ont été excisés et envoyés pour analyse par spectrométrie de masse au Centre protéomique de l'est du Québec, au centre hospitalier de l'Université Laval à Québec. Les morceaux de gel ont été déposés dans des plaques de 96 puits et soumis à la procédure de digestion à la trypsine par le robot de digestion MassPrep (Perkin Elmer) selon les spécifications du manufacturier et selon le protocole de Shevchenko *et al.* (329) avec les modifications de Havlis *et al.* (137). Brièvement, les morceaux de gel ont été lavés avec de l'eau distillée et de l'acétonitrile, traités avec du DTT 10 mM, puis avec de l'iodoacétamide 55 mM. Les protéines présentes dans les morceaux de gel ont ensuite été digérées avec de la trypsine modifiée de grade « séquençage » (Promega) pendant 60 min à 58°C. Les peptides ont été extraits avec une solution composée d'acétonitrile/eau (50-50, v/v), puis séchés par évaporation et resuspendus dans 10 µl d'une solution d'acide formique 0,1%. Les peptides ont par la suite été injectés sur une colonne de chromatographie capillaire de phase inverse (PicoFrit Biobasic C18, 10 cm x 75 µm, New Objective) couplée à un spectromètre de masse de type piège ionique quadripolaire LCQ DecaXP (ThermoFisher) avec un interface de type nanovaporisation. Les peptides ont été élués de la colonne à l'aide d'un gradient linéaire d'acétonitrile (2% à 50% en 30 min) dans une solution d'acide formique 0,1% à une vitesse d'élution de 200 nl/min. L'acquisition des spectres de masse a été faite selon un mode donnée-dépendante dans lequel un spectre (balayage complet de 400-2 000 Th) est suivi par la dissociation induite par collision des

trois ions les plus intenses. La fonction d'exclusion dynamique a été activée (30 secondes) et l'énergie relative de la fragmentation induite par collision a été réglée à 35%. Les spectres MS/MS des peptides ainsi obtenus ont été analysés par l'algorithme de recherche MASCOT (270) et les recherches ont été faites dans la banque de protéines NCBI nr. La carbamidométhylation des cystéines, l'oxydation partielle de la méthionine, deux clivages manqués et une tolérance à l'erreur de 2,0 Da pour les peptides ont été considérés lors de la recherche. Un peptide était considéré comme identifié lorsque le score MASCOT était supérieur à 48, soit la valeur minimale où l'identité, ou homologie importante, calculée par le programme est de $p < 0,05$. La validation manuelle des spectres a permis de confirmer les identifications. Cette partie du travail a été faite au centre hospitalier de l'Université Laval à Québec par les employés du Centre protéomique de l'est du Québec sous la supervision du Dre Sylvie Bourassa.

2.20 Purification et manipulation de l'ARN

Tous les tampons et échantillons employés lors de la manipulation et la purification de l'ARN ont été préparés et traités afin d'être exempt d'ARNase et employés tels que décrit précédemment (25). Les cellules de streptocoques ont été cultivées dans 25 ml de milieu TYE additionné de mélibiose ou de glucose à 0,4% (p/v) ou 0,2% (p/v). Les cellules ont été récoltées lorsque la densité optique à 660 nm des cultures atteignait 0,4 pour les cellules en phase exponentielle de croissance et 0,7 pour les cellules en phase stationnaire de croissance. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (10 min à $20\,000 \times g$ à 4°C) et remises en suspension dans 600 µl de tampon RLT provenant de la trousse d'isolation de l'ARN RNeasy (Qiagen) additionné de 6 µl de β -mercaptoéthanol 14,3 M. Les cellules ont ensuite été lysées par l'addition de 0,35 g de billes de verre (150 à 212 µm de diamètre) suivie de trois agitations successives de 1 min avec l'appareil Mini-BeadBeater (BioSpec) réglé à intensité 5. Entre chaque agitation, une pause de 1 min était respectée. Les débris cellulaires et les billes de verre ont été retirés par centrifugation (2 min à $13\,000 \times g$ à 4°C). L'ARN a d'abord été isolé selon la procédure établie par le manufacturier de la trousse de purification d'ARN RNeasy. Une seconde purification au Trizol (Invitrogen) a été effectuée selon la procédure établie par le manufacturier. Finalement, l'ARN a été dosé par

mesure de l'absorbance à 260 nm (DU530, Beckman) avant d'être aliquoté et conservé à -80°C.

2.21 Analyse de type Northern

Dans un premier temps, les ARN totaux ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (0,8% ou 1%) en présence de 6,6% de formaldéhyde. Tous les tampons et échantillons ont été préparés et traités afin d'être exempts d'ARNase et employés tel que décrit précédemment (25). L'ARN total (2 µg) de *S. salivarius* ATCC 25975 ou du mutant G71 a été transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) à l'aide du Turboblotter (Schleicher & Schuell) ou du Posiblot (Invitrogen) selon les instructions des manufacturiers. L'ARN total a été fixé par pontage à la membrane suite à une exposition aux rayons ultraviolets. Un marqueur de taille d'ARN (Invitrogen) a été employé afin de déterminer la taille des transcrits. La sonde nucléotidique employée lors des analyses Northern a été préparée selon la procédure suivante. La sonde *pts* est un amplicon de 446 pb correspondant à la séquence nucléotidique comprise entre les nucléotides 1 à 446 et amplifiée à l'aide des amorces ptsH1C (5'-ACCAGTAAAATGAGAGAC-3') et ptsI32R (5'-GATGCTGCGATTCCTTT-3') (99). Cette sonde couvre entièrement le gène *ptsH* et la portion 5' du gène *ptsI*. La sonde a été marquée à la digoxigénine-11-dUTP à l'aide du mélange d'oligonucléotides PCR Dig labelling mix (Roche) selon les recommandations du fabricant. Les conditions employées lors de l'amplification en chaîne par polymérase pour la synthèse de la sonde *pts* sont indiquées au tableau 3.

Chapitre 3

Au sujet de HPr(Ser-P)(His~P)

3.1 HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries de la classe des *Bacilli*

La présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries à faible teneur en G+C a fait l'objet de plusieurs mentions dans la littérature. Les résultats sont souvent contradictoires (56, 127) et parfois, malgré l'observation du produit doublement phosphorylé, la présence de HPr(Ser-P)(His~P) est passée sous silence (20). Le premier objectif de ce travail était de déterminer si HPr(Ser-P)(His~P) est présent chez certaines bactéries de la classe des *Bacilli* reconnues pour leur caractère pathogène ou leur utilisation à des fins industrielles. Dans un second temps, nous avons vérifié si cette forme de HPr est en mesure de remplir la fonction que HPr(His~P) joue dans le transport des sucres par le système PTS. Les genres bactériens étudiés ont été : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Bacillus*.

3.1.1 Présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez des bactéries de la classe des *Bacilli*

3.1.1.1 Purification de HPr de *S. aureus* en vue de produire des anticorps

La détermination des niveaux cellulaires des différentes formes de HPr par immunoelectrophorèse requiert des anticorps réagissant avec la protéine HPr. Nous avons donc, dans un premier temps, vérifié si les protéines HPr des différentes espèces bactériennes étudiées étaient reconnues par les anticorps anti-HPr à notre disposition. Pour ce faire, des extraits protéiques solubles provenant des différentes souches étudiées ont été séparés par PAGE, puis les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose en vue d'effectuer des immunobuvardages de type Western en présence de l'un ou l'autre des antisérums anti-HPr que nous possédions. Nous avons ainsi déterminé que les protéines HPr de *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. bovis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. casei* et *L. lactis* ssp. *lactis* réagissaient en présence des anticorps anti-HPr de *S. salivarius*, que les protéines HPr de *B. subtilis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *L. casei* réagissaient en présence des anticorps anti-HPr de *B. subtilis* et que les protéines HPr de *S. pneumoniae*, *S. suis*, *E. faecalis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. casei* et *L. lactis* ssp. *cremoris* réagissaient en présence des anticorps anti-HPr de *S. mutans*. Aucun antisérum anti-HPr n'a réagi en présence des extraits cellulaires de *S. aureus*. Ce résultat, bien que surprenant, n'est pas sans précédent. En effet, les antisérums anti-HPr de *S. salivarius* ne reconnaissent pas ou très peu la protéine HPr de *S. mutans* et vice versa, et ce, malgré un pourcentage d'identité supérieur à 95% entre les deux protéines HPr. Nous avons donc purifié la protéine HPr de *S. aureus* afin d'obtenir des anticorps spécifiques à cette protéine.

Dans un premier temps, nous avons tenté une approche génétique visant à surproduire la protéine chez *E. coli* en clonant le gène *ptsH* de *S. aureus* dans un vecteur d'expression. Suite à l'incapacité d'obtenir un clone viable de *E. coli* porteur des vecteurs d'expression pET19b ou pBAD codant pour le gène *ptsH* de *S. aureus*, le gène codant pour la protéine HPr de *S. aureus* a été cloné dans le vecteur d'expression pETcoco. En plus de permettre la surexpression de protéines, ce vecteur permet de contrôler le nombre de copie du plasmide chez la cellule hôte (325). Malgré de multiples essais, aucun transformant n'a pu être

obtenu. Il semble donc que le gène *ptsH* de *S. aureus* ou le produit de ce gène est toxique pour les souches de *E. coli* employées.

HPr a donc été purifiée à partir d'extraits protéiques solubles de *S. aureus* ATCC 6538 tel que décrit à la section Matériel et Méthodes (voir section 2.9.1, page 58). La pureté des fractions après les différentes étapes de purifications a été évaluée par SDS-PAGE (Fig. 22A). Un premier fractionnement des extraits a été effectué sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anion. Un gradient salin a été appliqué afin de déplacer graduellement les protéines chargées négativement de la résine. Afin de déterminer les fractions contenant HPr, ces dernières ont été soumises à un essai de phosphorylation en présence de la HprK/P de *S. salivarius* et d'ATP marqué au ^{32}P (Fig. 22B). Cet essai a démontré, dans la fraction éluée avec 100 mM de NaCl, la présence d'une protéine de la taille attendue, phosphorylée par la HprK/P (Fig. 22A, puits 2). Les fractions contenant HPr ont été réunies, puis acidifiées temporairement à pH 5,0 afin de permettre la précipitation de diverses protéines ayant un pI voisin de ce pH. Le pI théorique de HPr de *S. aureus* étant de 4,5, la protéine est en mesure de conserver une charge négative et de rester en solution. L'analyse par SDS-PAGE de la fraction soluble, après concentration, a confirmé la présence de la protéine HPr dans cette fraction (Fig. 22A, puits 3). Cette fraction a finalement été purifiée par chromatographie sur une colonne de Superdex 75 10/300 GL (Fig. 22A, puits 4-7). Suite à cette dernière chromatographie, une portion de gel contenant la protéine HPr a été excisée d'un gel de polyacrylamide et envoyée pour analyse par spectrométrie de masse. Le résultat a confirmé que la protéine purifiée était HPr de *S. aureus*. Enfin, la protéine purifiée a été injectée à des lapins pour produire des anticorps.

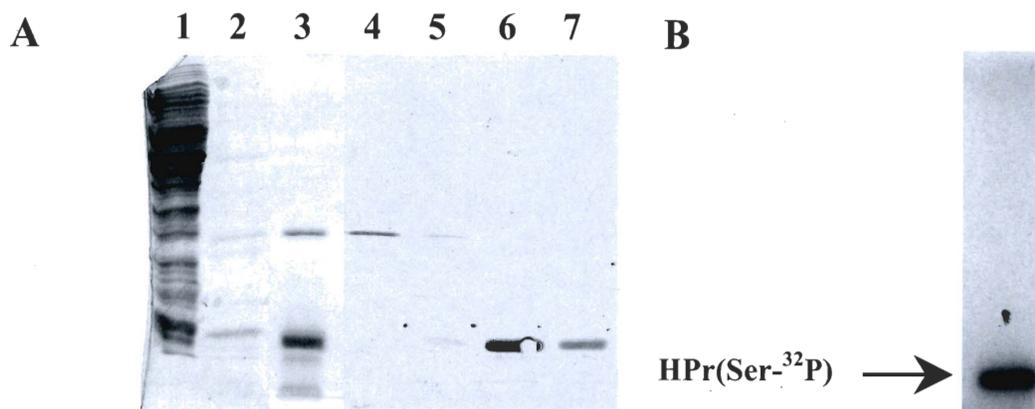


Figure 22 : Purification de la protéine HPr de *S. aureus*. A. Analyse par SDS-PAGE de fractions protéiques provenant des différentes étapes de purification de la protéine HPr. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie. Puits 1, extrait protéique soluble de *S. aureus*; puits 2, fraction contenant la protéine HPr éluée à 100 mM de NaCl sur colonne échangeuse d'anion mono Q; puits 3, fraction concentrée contenant HPr suite à l'acidification du milieu et à la précipitation des protéines de la fraction en 2; puits 4-7, Éluion de la fraction 3 sur tamis moléculaire Superdex 75 10/300 GL. Une portion de gel, contenant la protéine purifiée présente dans le puits 6 a été analysée afin de confirmer que la bande observée correspondait à HPr. B. Localisation de la protéine HPr dans les fractions éluées de la colonne d'échangeur d'ion en utilisant un essai de phosphorylation aux dépens de l'ATP marqué au ^{32}P avec HprK/P. La fraction présentée sur cet autoradiogramme correspond à celle éluée à 100 mM de NaCl.

3.1.1.2 Sensibilité des souches à la gramicidine D ou à un autre ionophore

Afin de déterminer les niveaux cellulaires des différentes formes de HPr, les cellules doivent être récoltées dans des conditions particulières afin de prévenir toutes modifications importantes des ratios de ces différentes formes. Le chloramphénicol permet d'arrêter la croissance de *S. salivarius* et de *S. mutans* alors que l'addition de gramicidine D, un peptide formant des pores transmembranaires et favorisant l'échange rapide des ions K^+ intracellulaires contre des ions H^+ extracellulaires (135), combinée à une acidification rapide du milieu de culture, est une procédure qui a été employée afin d'inactiver les enzymes EI et HprK/P de ces bactéries (369). Nous avons donc, dans un premier temps, vérifier la sensibilité des différentes souches bactériennes étudiées (Tableau 2) à la gramicidine D. Ainsi, il a été observé que la croissance de toutes les espèces bactériennes testées, exception faite de *L. casei* et *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, était inhibée par la présence de cet ionophore à une concentration finale de 1 μM . La figure 23 illustre le résultat type obtenu suite à l'addition de la gramicidine D aux milieux de culture : un arrêt immédiat et permanent de la croissance bactérienne. Compte tenu de la résistance de *L.*

casei et *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* à la gramicidine D, nous avons testé leur sensibilité aux protonophores gramicidine S, nigéricine, valinomycine, CCCP et FCCP. Ces protonophores favorisent l'échange rapide des K^+ pour des protons (gramicidine S, valinomycine et nigéricine) ou, dans le cas des molécules CCCP et FCCP, interviendraient dans le mécanisme de synthèse de l'ATP par abolition de la force proton motrice. Tout comme pour la gramicidine D, ces ionophores ont tous été inefficaces pour inhiber complètement la croissance des lactobacilles. Ceux-ci ont donc été retirés de l'étude.

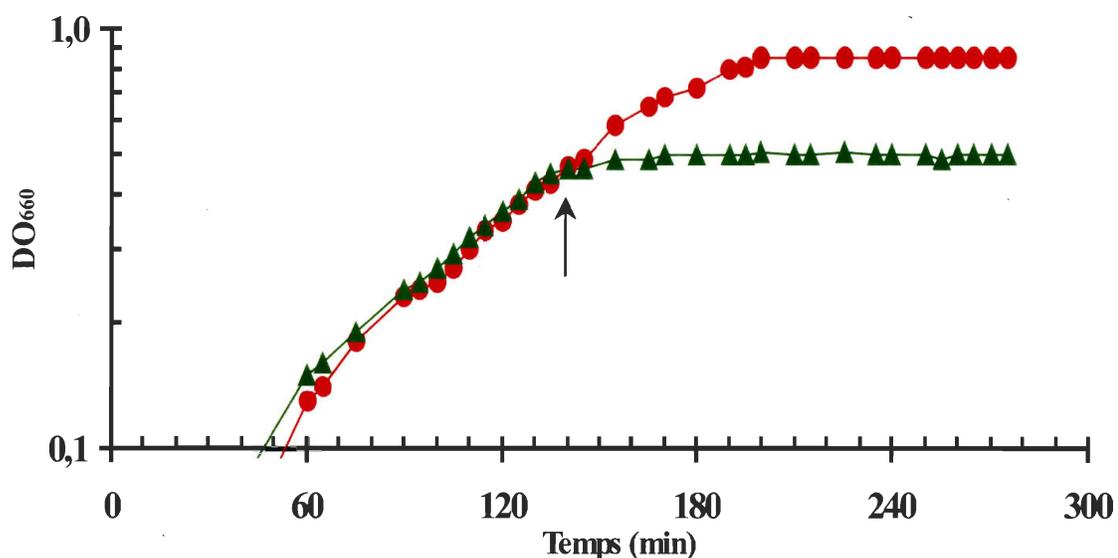


Figure 23 : Effet de la gramicidine D sur la croissance de *S. salivarius* ATCC 25975. Les cellules ont été cultivées à 37°C en présence de 0,2% glucose. (●) Croissance en absence de gramicidine D. (▲) Croissance en présence de 1 μM de gramicidine D. La flèche représente le moment où la gramicidine D a été ajoutée au milieu de culture.

3.1.1.3 Détermination par immunoélectrophorèse croisée des différentes formes de HPr chez diverses espèces bactériennes de la classe des *Bacilli*

Pour chacune des souches bactériennes que nous avons étudiées, des cultures en présence de glucose ont été effectuées. En phase exponentielle de croissance, du chloramphénicol et de la gramicidine D ont été ajoutés au milieu de culture qui a ensuite été rapidement acidifié par addition de HCl. Les extraits protéiques solubles ont été préparés tel que décrit précédemment (voir sections 2.2 et 2.4, pages 51 et 52). Les niveaux des différentes formes de HPr contenues dans les extraits ont été mesurés par immunoélectrophorèse croisée à l'aide des anticorps appropriés (369). Cette technique permet une séparation claire de HPr,

HPr-P et HPr(Ser-P)(His~P). Bien que HPr(His~P) et HPr(Ser-P) migrent à la même position, ces deux formes peuvent être distinguées suite à un traitement thermique de 5 min à 100°C : le lien phosphoramidate de HPr(His~P) est instable à la chaleur contrairement au lien phosphoester de HPr(Ser-P) qui est résistant à la chaleur. L'analyse de l'aire sous les arcs d'immunoprécipités provenant des extraits chauffés et non chauffés permet de mesurer les proportions des différentes formes de HPr présentes dans les extraits (Fig. 24).

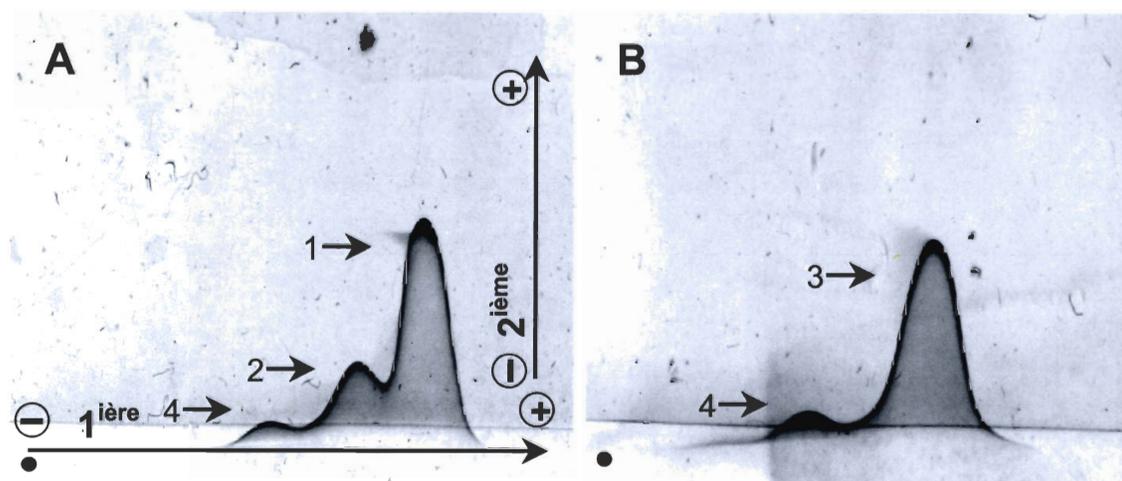


Figure 24 : Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr chez *S. pneumoniae* R800 par immunoelectrophorèse croisée. A, Extrait récolté en phase exponentielle de croissance, B, même extrait qu'en A, traité 5 min à 100°C. Les chiffres représentent les immunoprécipités correspondant à 1, HPr(Ser-P)(His~P); 2, HPr(His~P) et / ou HPr(Ser-P); 3, HPr(Ser-P); 4, HPr libre. Les flèches indiquent la direction de la migration au cours de la première (flèche horizontale) et de la deuxième (flèche verticale) électrophorèse. Le cercle noir correspond au point d'initiation de la première électrophorèse. Les arcs de précipitation ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie.

Dans un premier temps, la détermination des différentes formes de HPr a été faite à partir d'extraits protéiques ayant été obtenus après 16 h de centrifugation avant d'être analysés (Tableau 4) (369). Les différents extraits ont été obtenus de cellules qui avaient été cultivées à 37°C, à l'exception des lactocoques, qui ont été cultivés à 30°C. Des niveaux significatifs de HPr(Ser-P)(His~P) (25% à 75% de la somme des différentes formes de HPr) ont été observés chez la plupart des streptocoques ainsi que chez les souches de *L. lactis*. En revanche, cette forme de HPr était absente ou en très faible quantité chez *B. subtilis* et *E. faecalis*. À notre surprise, chez *S. suis*, des niveaux importants de HPr(Ser-P)(His~P) ont été détectés chez la souche 24 et non chez la souche ATCC 43765.

De plus, contrairement aux autres espèces de streptocoques employés lors de cette étude, de hauts niveaux de HPr libre ont été observés dans les deux souches de *S. suis*.

Tableau 4 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunoelectrophorèse croisée

Organisme	Souche	Concentration cellulaire de HPr ^a			
		HPr	HPr(His~P)	HPr(Ser-P)	HPr(His~P)(Ser-P)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6051	2 ± 3	ND ^b	98 ± 3	ND
<i>E. faecalis</i>	ATCC 35550	5 ± 2	<1	93 ± 3	2 ± 2
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	ATCC 19257	12 ± 7	32 ± 7	28 ± 8	28 ± 6
	MG1363	2 ± 0	<1	24 ± 2	74 ± 2
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	<1	2 ± 1	32 ± 1	66 ± 1
<i>S. bovis</i>	ATCC 35034	ND	26 ± 11	12 ± 5	62 ± 7
<i>S. mutans</i> ^c	DR0001	ND	ND	71 ± 11	29 ± 7
<i>S. pneumoniae</i>	R800	5 ± 2	4 ± 0	16 ± 0	75 ± 2
<i>S. salivarius</i>	ATCC 25975	1 ± 1	1 ± 2	50 ± 10	48 ± 12
<i>S. suis</i>	ATCC 43765	76 ± 4	4 ± 3	16 ± 8	4 ± 1
	24	36 ± 16	12 ± 6	24 ± 3	28 ± 13
<i>S. thermophilus</i> ^d	ATCC 19258	ND	10 ± 4	15 ± 2	75 ± 6
	SMQ-301	5 ± 4	56 ± 7	14 ± 3	25 ± 0
<i>S. vestibularis</i>	ATCC 49124	ND	ND	59 ± 2	41 ± 2

^a La proportion des différentes formes de HPr est exprimée en pourcentage. Les valeurs (± écart type) sont les moyennes de trois dosages différents effectués à partir d'extraits provenant de cultures différentes. Les cultures, récoltées en phase exponentielle de croissance, ont été faites en présence de 0,4% (p/v) glucose à l'exception de *S. suis* où la concentration en sucre était de 0,2% (p/v).

^b ND non détecté.

^c Résultat tiré de (369).

^d Résultat tiré de (57).

Ces résultats pouvaient s'expliquer par le fait que certaines formes phosphorylées du HPr de *S. suis*, plus particulièrement la forme phospho-histidine, étaient moins stables que ses homologues des autres espèces de streptocoques étudiées. Dans le but de vérifier si la durée de centrifugation des extraits protéiques, nécessaire à la sédimentation des membranes et donc à l'obtention d'extraits protéiques solubles, pouvait causer une déphosphorylation de certaines formes de HPr, nous avons répété l'expérience en réduisant le temps de centrifugation à 90 min et en effectuant l'analyse par immunoelectrophorèse croisée dans la même journée. Les résultats (Tableau 5) ont révélés des niveaux élevés de HPr(Ser-P)(His~P) chez les deux souches de *S. suis* (près de 50%) et de faibles niveaux de HPr libre (inférieurs à 10%). Ces résultats suggèrent que la stabilité de la forme doublement

phosphorylée de HPr varie en fonction de l'espèce bactérienne, voire de la souche. Il fut donc décidé de vérifier si la durée de l'ultracentrifugation change de façon significative les résultats obtenus avec les autres espèces bactériennes, et en particulier avec celles présentant peu ou pas de HPr(Ser-P)(His~P). Ainsi, en procédant avec une centrifugation de 90 min au lieu de 16 h, une proportion légèrement supérieure de HPr doublement phosphorylée a été mesurée chez *S. salivarius*, la différence étant cependant moins importante que celle observée pour *S. suis* ATCC 43765. Une proportion supérieure de HPr(Ser-P)(His~P) a aussi été mesurée dans les extraits protéiques solubles de *L. lactis* ssp. *cremoris* ATCC 19257. À l'exception de *S. suis* ATCC 43765, l'augmentation de HPr(Ser-P)(His~P) était accompagnée par une baisse des niveaux de HPr(Ser-P). En ce qui concerne *B. subtilis* et *E. faecalis*, la réduction de la durée de centrifugation n'a eu aucun effet marqué sur les proportions des différentes formes de HPr. Enfin, le dosage des différentes formes de HPr chez *S. aureus* a montré que cette espèce bactérienne, tout comme *B. subtilis* et *E. faecalis*, ne produisait pas de quantité détectable de HPr(Ser-P)(His~P) et contenait du HPr libre et du HPr(His~P) qu'en faible quantité (Tableau 5).

Tableau 5 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunoelectrophorèse croisée à partir d'extraits protéiques ayant été centrifugés pendant 90 minutes

Organisme	Souche	Concentration cellulaire de HPr ^a			
		HPr	HPr(His~P)	HPr(Ser-P)	HPr(His~P)(Ser-P)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6051	9 ± 1	4 ± 2	87 ± 3	ND ^b
<i>E. faecalis</i>	ATCC 35550	3 ± 1	<1	97 ± 0	ND
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	ATCC 19257	18 ± 1	23 ± 6	8 ± 4	51 ± 1
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	2 ± 1	2 ± 1	96 ± 2	ND
<i>S. salivarius</i>	ATCC 25975	3 ± 1	3 ± 2	32 ± 5	62 ± 5
<i>S. suis</i>	ATCC 43765	6 ± 3	27 ± 10	14 ± 5	53 ± 9
	24	9 ± 0	31 ± 3	15 ± 4	45 ± 7

^a La proportion des différentes formes de HPr est exprimée en pourcentage. Les valeurs (± écart type) sont les moyennes de trois dosages différents effectués à partir d'extraits provenant de cultures différentes. Les cultures, récoltées en phase exponentielle de croissance, ont été faites en présence de 0,4% (p/v) glucose à l'exception de *S. suis* où la concentration en sucre était de 0,2% (p/v).

^b ND non détecté.

3.1.1.4 Détermination par immunobuvardage de type Western des différentes formes de HPr chez diverses espèces bactériennes de la classe des *Bacilli*

Les niveaux cellulaires des différentes formes de HPr ont déjà été déterminés chez plusieurs bactéries par immunobuvardage de type Western (20, 129, 196, 245, 247). En effet, à l'exception des travaux effectués dans le laboratoire du Dr Christian Vadeboncoeur, aucune étude connue portant sur la mesure des ratios de HPr n'emploie la méthode d'immunoélectrophorèse croisée. Il paraissait donc important de vérifier si l'immunobuvardage de type Western donnait des résultats similaires à ceux obtenus par immunoélectrophorèse croisée. Ainsi, en parallèle aux mesures effectuées par immunoélectrophorèse, les différentes formes de HPr chez quelques souches sélectionnées ont été mesurées par la méthode d'immunobuvardage de type Western. Afin de limiter la variation entre extraits protéiques solubles provenant de cultures différentes, les mesures par immunobuvardage ont été effectuées sur les mêmes extraits, centrifugés 16 h, qui ont été utilisés pour la détermination des proportions des différentes formes de HPr par immunoélectrophorèse croisée. De plus, la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ainsi que le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose ont été faits au même moment que les immunoélectrophorèses. Les résultats (Tableau 6) indiquent que, dans la majorité des cas, les proportions de HPr(Ser-P)(His~P) mesurées par cette technique étaient beaucoup plus faibles que celles déterminées par immunoélectrophorèse. Dans le cas de *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. bovis* et *S. pneumoniae*, la baisse de HPr(Ser-P)(His~P) variait d'un facteur deux à cinq selon l'espèce. De plus, alors que, pour la majorité des espèces, les immunoélectrophorèses croisées ne révélaient que de faibles niveaux de HPr libre et de HPr(His~P), les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western suggéraient que ces formes de HPr étaient élevées. Ces résultats suggèrent que l'immunobuvardage de type Western n'est pas une technique appropriée pour déterminer les proportions des différentes formes de HPr chez les bactéries. En effet, les résultats suggèrent une dégradation des différentes formes de HPr menant, entre autres, à des proportions accrues en HPr libre et à une diminution de la proportion de HPr doublement phosphorylée.

Tableau 6 : Proportions relatives des différentes formes de HPr chez diverses bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, mesurées par immunobuvardage de type Western

Organisme	Souche	Concentration cellulaire de HPr ^a			
		HPr	HPr(His~P)	HPr(Ser-P)	HPr(His~P)(Ser-P)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6051	20 ± 3	<1	80 ± 5	ND ^b
<i>E. faecalis</i>	ATCC 35550	34 ± 4	<1	63 ± 19	3 ± 3
<i>L. lactis ssp. lactis</i>	ATCC 11454	12 ± 9	18 ± 10	16 ± 16	54 ± 16
<i>S. bovis</i>	ATCC 35034	3 ± 4	46 ± 6	18 ± 4	33 ± 5
<i>S. pneumoniae</i>	R800	41 ± 11	5 ± 14	23 ± 9	31 ± 4
<i>S. salivarius</i>	ATCC 25975	28 ± 18	27 ± 18	36 ± 7	9 ± 8
<i>S. suis</i>	ATCC 43765	88 ± 10	11 ± 10	1 ± 1	ND
<i>S. vestibularis</i>	ATCC 49124	4 ± 5	23 ± 15	58 ± 26	15 ± 13

^a La proportion des différentes formes de HPr est exprimée en pourcentage. Les valeurs (± écart type) sont les moyennes de trois dosages différents effectués à partir d'extraits provenant de cultures différentes. Les cultures, récoltées en phase exponentielle de croissance, ont été faites en présence de 0,4% (p/v) glucose à l'exception de *S. suis* où la concentration en sucre était de 0,2% (p/v).

^b ND non détecté.

3.1.1.5 HPr(Ser-P)(His~P) chez les lactobacilles

Des travaux antérieurs (369) rapportent que l'acidification du milieu intracellulaire chez les bactéries, à l'aide de l'ionophore gramicidine D, inhibe les activités de phosphorylation et de déphosphorylation de EI et HprK/P. Partant de ce principe, il a été proposé que l'acidification du milieu intracellulaire était nécessaire pour préserver les proportions intracellulaires des différentes formes de HPr pendant la récolte des cellules. Malheureusement, les souches de *Lactobacillus* employées lors de cette étude se sont avérées, du moins partiellement, résistante à l'effet bactériostatique de différents ionophores. Néanmoins, dans le but de déterminer si les bactéries de ce genre synthétisent HPr(Ser-P)(His~P) *in vivo*, la mesure des différentes formes de HPr chez des cellules de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* récoltées en phase exponentielle de croissance a été effectuée sans acidification du milieu. Dans ces conditions, 72% des HPr se trouvaient sous la forme libre alors que 28% étaient sous la forme HPr(His~P). Aucune HPr(Ser-P) et HPr(Ser-P)(His~P) n'ont été détectée chez *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (Tableau 7).

3.1.1.6 Importance et effet de l'acidification intracellulaire

3.1.1.6.1 Détermination des différentes formes de HPr chez *S. salivarius* en absence d'acidification intracellulaire

Dans le but de vérifier l'impact de l'absence de l'acidification du milieu sur la détermination des différentes formes de HPr, l'expérience a été reprise avec des cellules de *S. salivarius* ATCC 25975 présent en phase exponentielle de croissance mais non traitées à la gramicidine D. Dans ces conditions, nous avons détecté deux fois moins de produit doublement phosphorylé que ce qui avait été déterminé lorsque les cellules étaient traitées à la gramicidine D suivi d'une acidification du milieu (Tableaux 4, 5 et 7). De plus, nous n'avons pratiquement pas détecté de HPr(Ser-P), suggérant qu'il y ait eu hydrolyse du lien phosphoester dans ces conditions. Globalement, ces résultats suggèrent que l'acidification de l'espace intracellulaire est essentielle pour prévenir la déphosphorylation des phospho-HPr pendant la récolte des cellules et la préparation de l'extrait cellulaire. En conséquence, les résultats obtenus avec *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (voir section 3.1.1.5, page 81) ne serait pas le reflet réel des proportions des différentes formes de HPr chez cette espèce.

Tableau 7 : Proportions relatives des différentes formes de HPr mesurées par immunoelectrophorèse croisée sur des cellules dont la croissance a été arrêtée sans acidification du milieu intracellulaire

Organisme	Souche	Concentration cellulaire de HPr ^a			
		HPr	HPr(His~P)	HPr(Ser-P)	HPr(His~P)(Ser-P)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	KH4	72 ± 12	28 ± 12	ND ^b	ND
<i>S. salivarius</i>	ATCC 25975	31 ± 1	48 ± 5	<1	21 ± 6

^a La proportion des différentes formes de HPr est exprimée en pourcentage. Les valeurs (± écart type) sont les moyennes de trois dosages différents effectués à partir d'extraits provenant de cultures différentes. Les cultures, récoltées en phase exponentielle de croissance, ont été faites en présence de glucose à une concentration de 0,4% (p/v).

^b ND non détecté.

3.1.1.6.2 Effet de l'acidification sur la HprK/P chez *B. subtilis*

Compte tenu du fait que nous n'avons pas détecté de HPr(Ser-P)(His~P) chez *B. subtilis*, il parut important de confirmer que l'acidification de l'espace intracellulaire inhibait efficacement l'EI et la HprK/P chez cette bactérie. Des travaux antérieurs ont montré qu'à des pH inférieurs à 4,7, l'enzyme I de *B. subtilis* est incapable de phosphoryler HPr (48). Ces résultats suggèrent donc que EI, à pH 4,5, serait inactive. Afin de vérifier l'impact du

pH sur les activités de la HprK/P de *B. subtilis*, des essais de phosphorylation et de déphosphorylation ont été faits en présence d'extraits cellulaires totaux de *B. subtilis* et de HPr ou de HPr(Ser-P) à pH 7,5 et 4,5 (voir section 2.11, page 63). Ainsi, pour mesurer l'activité kinase, la HprK/P de *B. subtilis*, retrouvée dans l'extrait cellulaire, a été incubée en présence de 10 µg de HPr et de l'ATP alors que pour mesurer l'activité phosphorylase, la HprK/P a été incubée en présence de 10 µg de HPr(Ser-P) et de P_i. Après une incubation de deux heures, 2 µg de HPr(Ser-P) ont été synthétisé alors qu'aucune activité n'a été observée à pH 4,5 (Fig. 25A). Des résultats similaires ont été obtenus lors de la mesure de l'activité phosphorylase de la HprK/P où 6,5 µg de HPr libre ont été obtenus après une incubation de deux heures alors qu'aucune activité n'a été observée à pH 4,5 (Fig. 25B). Ces résultats sont en accord avec les données rapportées pour l'enzyme purifiée de *S. salivarius* (44, 48, 369). Ainsi, l'absence de HPr(Ser-P)(His~P) observée dans les extraits protéiques de *B. subtilis* ne serait pas le fruit d'une dégradation de cette forme par la HprK/P ou par EI mais refléterait plutôt la situation *in vivo*.

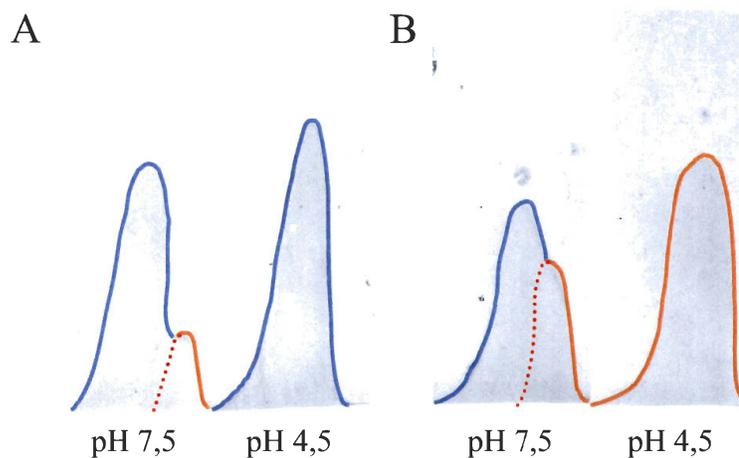


Figure 25 : Détermination de l'activité kinase et phosphorylase de la HprK/P de *B. subtilis*. A, Fractionnement, par immunoélectrophorèse croisée, des milieux réactionnels initialement constitués de 10 µg de HPr libre et d'extrait cellulaire de *B. subtilis* afin de confirmer la présence ou l'absence de l'activité kinase de la HprK/P de *B. subtilis* à pH 7,5 et 4,5. B, Fractionnement, par immunoélectrophorèse croisée, des milieux réactionnels initialement constitués de 10 µg de HPr(Ser-P) et d'extrait cellulaire de *B. subtilis* afin de confirmer la présence ou l'absence de l'activité phosphorylase de la HprK/P de *B. subtilis* à pH 7,5 et 4,5. Les pics en bleu correspondent à la protéine HPr alors que les pics en orange correspondent à la protéine HPr(Ser-P). Les essais ont été réalisés à 37°C en présence de HPr ou de HPr(Ser-P) recombinant et d'extraits cellulaires totaux de *B. subtilis*. Les arcs de précipitation ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie.

3.2 Rôle de HPr(Ser-P)(His~P)

La littérature aborde et discute amplement des rôles et fonctions attribués à HPr autant pour la forme HPr(Ser-P) que pour la forme HPr(His~P) (70). En revanche, à part deux études portant sur la capacité de HPr(Ser-P)(His~P) à phosphoryler le domaine IIA du transporteur du lactose LacS (56, 202), aucune autre fonction ne lui a été attribuée. Avec la démonstration que cette forme de HPr était abondante chez les streptocoques et les lactocoques en phase exponentielle de croissance, il devenait important de déterminer si HPr(Ser-P)(His~P) participait au transport des sucres par le PTS et de déterminer si HPr(Ser-P)(His~P) était capable de transférer son groupement phosphorylé à des protéines non-PTS phosphorylées par HPr(His~P). Pour démontrer cette dernière fonction, nous avons étudié la phosphorylation de la glycérol kinase de *E. casseliflavus* par HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(His~P) de *S. salivarius*, *E. casseliflavus* et *B. subtilis*.

3.2.1 Étape préliminaire

Les études mentionnées au paragraphe précédent nécessitaient l'utilisation de protéines purifiées. De plus, plusieurs essais devaient se faire en utilisant du PEP[³²P]. Ainsi, certaines manipulations préparatoires, nécessaire à l'ensemble des essais fait au cours de cette étude, seront décrites ci-bas. Cette section se limite à la description des synthèses, clonages et purifications des protéines utilisées tout au cours de ces travaux.

3.2.1.1 Synthèse de phosphoénolpyruvate marqué au ³²P

La protéine HPr exerce ses rôles régulateurs de deux façons : par interaction protéine-protéine ou par transfert d'un groupement phosphorylé sur un résidu histidine. Il est reconnu que HPr(Ser-P)(His~P), contrairement à HPr(Ser-P), n'est pas en mesure d'interagir avec CcpA (74). En revanche, il est en mesure de transférer le groupement phosphorylé présent sur son résidu histidine aux domaines IIA de LacS chez *S. salivarius* et *S. thermophilus* (56, 202). Ces données suggèrent qu'une des fonctions de HPr(Ser-P)(His~P) serait de participer au transfert de sucres PTS en transférant un groupement phosphorylé à des domaines IIA du PTS.

L'approche classique employée pour suivre ces réactions consiste à observer le transfert du groupement phosphoryle d'une protéine à une autre. Ce suivi peut être effectué de façon directe grâce à l'utilisation d'une source de PEP marquée à l'aide de l'isotope radioactif ^{32}P . *In vivo*, la synthèse du PEP peut être catalysée par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPck) qui catalyse la réaction suivante : l'oxaloacétate perd une molécule de CO_2 et récupère le groupement phosphoryle en position γ de l'ATP (Fig. 19). À ce jour, il n'existe aucune source commerciale de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$. Cependant, Mattoo et Waygood (228) ont développé une procédure permettant la synthèse *in vitro* de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ en se basant sur la réaction de la PEPck. La demi-vie de l'isotope ^{32}P étant relativement courte, 14 jours, la synthèse de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ devait être reprise à toutes les semaines afin d'être en mesure de maintenir un taux élevé de radioactivité spécifique lors des différents essais.

Dans un premier temps, le $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ a été synthétisé selon les conditions décrites à la section 2.4. Le mélange réactionnel a ensuite été fractionné à l'aide de la résine échangeuse d'anion Dowex AG-1-X8. Les composés d'intérêts ont été élués par l'addition d'une solution de bicarbonate de triéthylammonium (TEAB) à concentration croissante. Suite à cette purification, les différentes fractions ont été analysées afin de sélectionner celles contenant uniquement du $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$. Pour ce faire, une aliquote de chacune des fractions a été déposée sur du papier à chromatographie DEAE-cellulose DE 81, un échangeur d'anion légèrement basique. Généralement, le $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ était élué à une concentration de 0,7 M de TEAB (Fig. 26A). Compte tenu que les protéines marquées lors des essais de phosphorylation sont révélées par autoradiographie et que la présence d'ATP marquée pouvait interférer avec l'analyse des résultats *via* la phosphorylation de protéines contaminantes, les fractions sélectionnées de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ ont été testées afin de s'assurer qu'il ne restait aucune trace d'ATP contaminant. Pour ce faire, des essais de phosphorylation aux dépens du PEP ont été effectués afin de confirmer que EI était en mesure de phosphoryler HPr en présence de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ et des essais de phosphorylation ont été effectués afin de confirmer que HprK/P, qui utilise l'ATP comme source d'énergie, était incapable de phosphoryler HPr en utilisant comme source d'énergie la préparation purifiée de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ (Fig. 26B). Si cette dernière réaction ne permettait pas la synthèse de $\text{HPr}(\text{Ser-}^{32}\text{P})$, la préparation de $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ était considérée comme étant exempte d'ATP.

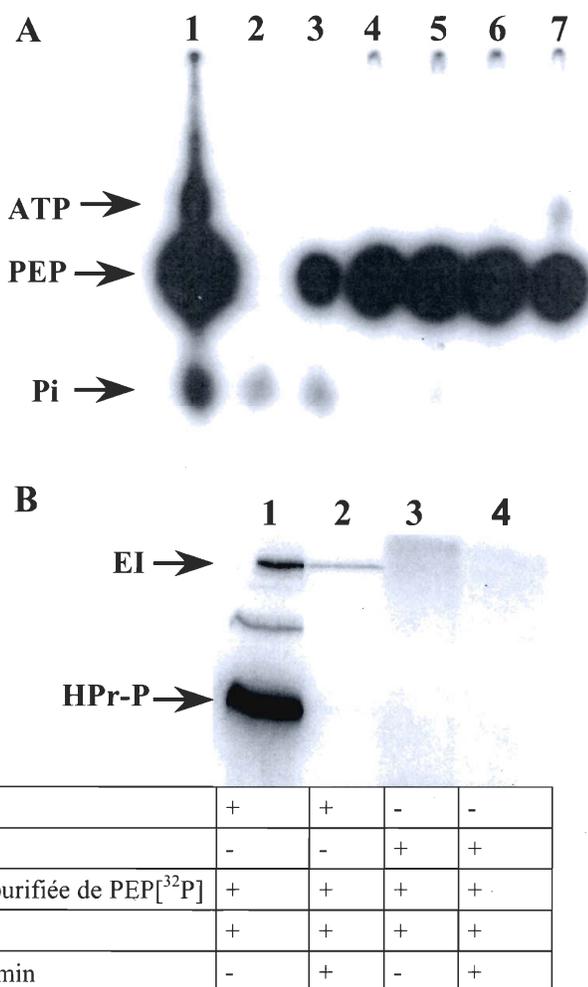


Figure 26 : Synthèse de PEP[³²P]. A, Analyse des fractions éluées de la résine échangeuse anionique Dowex AG-1-X8 par chromatographie sur papier DEAE-cellulose DE 81. Puits 1, mélange réactionnel de la synthèse de PEP[³²P] avant chromatographie sur la colonne de Dowex AG-1-X8; puits 2, fraction éluee à 0,4 M de TEAB; puits 3, fraction éluee à 0,6 M de TEAB; puits 4-6, fractions éluées à 0,7 M TEAB; puits 7, fraction éluee à 1 M TEAB. B, Analyse du contenu en PEP[³²P] et en ATP[γ -³²P] de la fraction de PEP[³²P] éluee à 0,7 M TEAB. Les essais ont été effectués en présence de EI à 1 mM, HprK/P à 1 mM, HPr à 10 mM et 0,5 μ Ci de PEP[³²P]. Certains essais ont été soumis à un traitement thermique de 5 min à 100°C. Puits 1 et 2, phosphorylation de HPr par EI suivi ou non d'un traitement thermique; puits 3 et 4, phosphorylation de HPr par HprK/P suivi ou non d'un traitement thermique. Les molécules et les protéines marquées avec l'isotope radioactif ³²P ont été révélées par autoradiographie.

3.2.1.2 Purification des protéines recombinantes EI, HPr et HPr(S46D) de *S. salivarius*

Pour effectuer les divers essais enzymatiques, plusieurs protéines recombinantes ont été employées. Bien que certaines de ces enzymes étaient déjà disponibles, l'enzyme HprK/P, par exemple, avait été préalablement purifiée par Israël Casabon, les protéines recombinantes EI, HPr et HPr(S46D) ont dû être purifiées à partir d'extrait cellulaire de *E. coli*. Ainsi, ces protéines ont été purifiées selon la méthode décrite précédemment à la section 2.9.2. Brièvement, les extraits protéiques solubles ont été fractionnés sur une résine d'affinité au nickel suivi d'une filtration sur un gel en utilisant une colonne de Superdex 75 10/300 GL ou Superdex 200 10/300 GL. Le degré de pureté des protéines recombinantes EI, HPr et HPr(S46D) a été déterminé par SDS-PAGE. Dans tous les cas, les préparations protéiques ont montré un degré de pureté supérieur à 95% (Fig. 27).

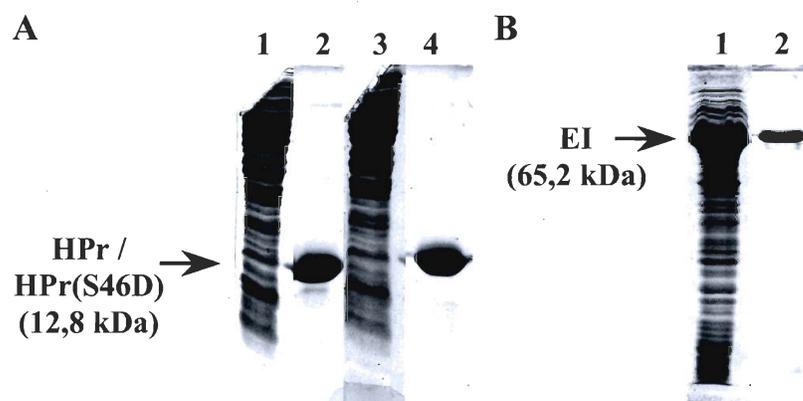


Figure 27 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes HPr, HPr(S46D) et EI de *S. salivarius*. Les protéines en A ont été séparées sur un gel contenant 15% d'acrylamide alors que celles en B ont été séparées sur un gel contenant 12% d'acrylamide. A, puits 1, extrait protéique brut de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante HPr; puits 2, HPr purifiée après passage sur Ni-NTA et tamis moléculaire Superdex 75 10/300 GL; puits 3, extrait protéique brut de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante HPr(S46D); puits 4, HPr(S46D) purifiée après passage sur Ni-NTA et tamis moléculaire Superdex 75 10/300 GL. B, puits 1, extrait protéique brut de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante EI; puits 2, EI purifiée après passage sur Ni-NTA et tamis moléculaire Superdex 200 10/300 GL. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

3.2.1.3 Synthèse de HPr(Ser-P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P)

Les protéines recombinantes HPr et HPr(S46D) de *S. salivarius* ont été utilisées pour synthétiser ou simuler la forme doublement phosphorylée de HPr. Pour la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P), His₆-HPr a d'abord été incubée en présence d'ATP et de l'enzyme HPrK/P afin de produire du HPr(Ser-P). Cette préparation a ensuite été purifiée tel que décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (voir section 2.12, page 63). Compte tenu que chez *S. salivarius*, à pH 7,9, la constante de spécificité (K_{cat}/K_M) de l'EI pour HPr est près de 5 000 fois supérieure à celle de EI pour HPr(Ser-P) (48), il était primordial de s'assurer qu'il y avait absence totale de HPr libre dans la préparation de HPr(Ser-P) purifiée car, même à de très faible concentration, la présence de HPr libre pouvait interférer avec les essais. Pour ce faire, une fraction du HPr(Ser-P) purifiée a été incubée en présence de EI et de PEP[³²P] (Fig. 28). L'absence d'un produit phosphorylé migrant à la hauteur de HPr(His~P) lors de la révélation des autoradiogrammes a confirmé l'absence de HPr libre dans la préparation.

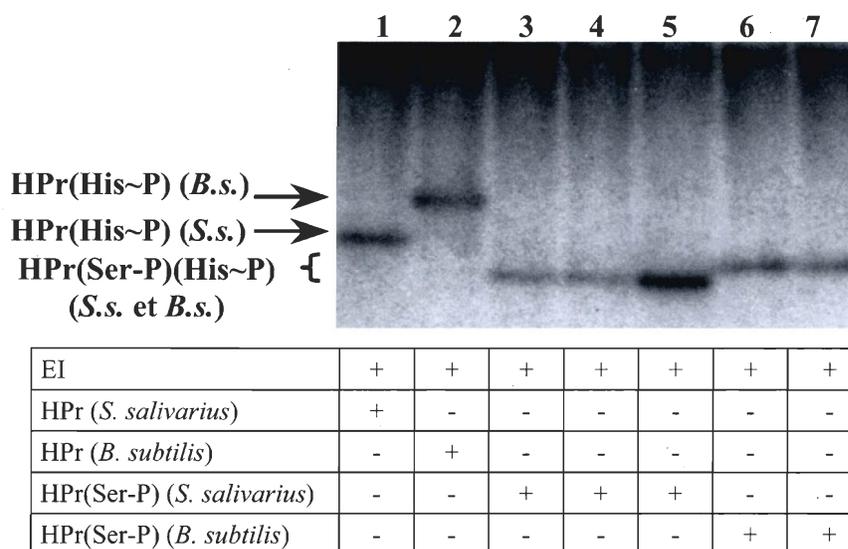


Figure 28 : Essais de phosphorylation aux dépens du PEP effectués avec différents lots de HPr(Ser-P) synthétisés en laboratoire. Les puits 1 et 2 présentent les contrôles de phosphorylation des HPr de *S. salivarius* et *B. subtilis* par EI aux dépens de PEP marqué au ³²P. Les puits 3 à 5 correspondent aux essais de phosphorylation de trois préparations de HPr(Ser-P) de *S. salivarius* issues de synthèses indépendantes. Les puits 6 et 7 correspondent aux essais de phosphorylation de deux préparations de HPr(Ser-P) de *B. subtilis* issues de synthèses indépendantes. Les protéines marquées par l'isotope ³²P ont été révélées par autoradiographie.

Lors de la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) à partir de HPr(Ser-P), les réactions ont été effectuées en présence de large excès de EI afin de favoriser la synthèse du produit doublement phosphorylé. De plus, le mélange réactionnel était conservé à 37°C pour une durée minimale de 45 min afin de maximiser la synthèse de produit doublement phosphorylé. Ces conditions ne permettent pas pour autant de transformer la totalité du HPr(Ser-P) présent en HPr(Ser-P)(His~P). Afin de déterminer la proportion de chacune des formes une fois la réaction à l'équilibre, nous avons réalisé des expériences à l'aide de PEP non radioactif. Nous avons pu ainsi montrer qu'il était possible de transformer entre 25% et 30% du HPr(Ser-P) en produit doublement phosphorylé (Fig. 29). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant HPr(S46D) comme substrat.



Figure 29 : Synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) de *S. salivarius*. Des aliquotes du milieu réactionnel contenant 10 μ M de HPr(Ser-P), 1 μ M de EI et 2 mM de PEP ont été prélevées aux temps 0, 15, 30, 45 et 60 min puis analysées par PAGE. Les puits 1 à 5 correspondent respectivement aux temps de prises des aliquotes à 0, 15, 30, 45 et 60 min. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

3.2.1.4 Purification des protéines recombinantes GlpK et HPr de *E. casseliflavus*

Les deux souches de *E. coli* portant les plasmides permettant la surexpression des protéines GlpK et HPr de *E. casseliflavus* ont été gracieusement fournies par le Dr Josef Deutscher (INRA, France). La procédure de purification demeure similaire à celle employée pour EI et HPr de *S. salivarius* à l'exception que les protéines ont été purifiées en une seule étape. En effet, suite au passage des extraits protéiques solubles sur la résine d'affinité Ni-NTA, les protéines GlpK et HPr de *E. casseliflavus* présentaient déjà un degré de pureté supérieure à 95% sur gel de polyacrylamide (Fig. 30).

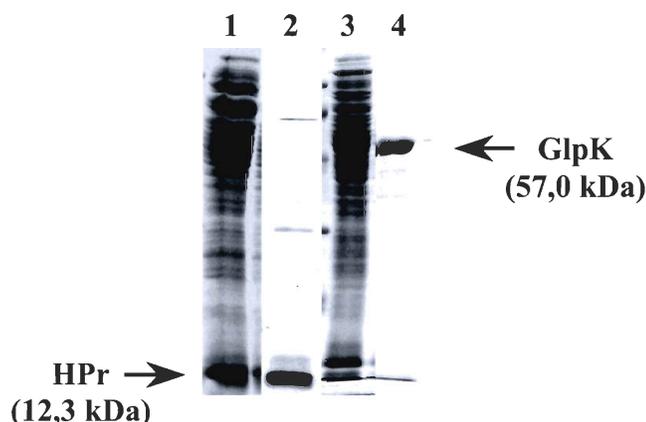


Figure 30 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes purifiées HPr et GlpK de *E. casseliflavus*. Les protéines ont été séparées sur un gel contenant 12% d'acrylamide. Puits 1, extrait protéique brut de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante HPr; puits 2, HPr purifiée après passage sur résine d'affinité Ni-NTA; puits 3, extrait protéique brut de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante GlpK; puits 4, GlpK purifiée après passage sur résine d'affinité Ni-NTA. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

3.2.1.5 Clonage de l'enzyme recombinante $\text{IIAB}_H^{\text{Man}}$

Tel que mentionné précédemment, la capacité de HPr(Ser-P)(His~P) à phosphoryler le domaine IIA du transporteur du lactose LacS (56, 202) suggère que cette forme de HPr pourrait être en mesure de participer au transport des sucres par le PTS. Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons voulu vérifier si la forme doublement phosphorylée du HPr de *S. salivarius* était en mesure de transférer son groupement phosphorylé aux enzymes $\text{IIAB}_L^{\text{Man}}$ et $\text{IIAB}_H^{\text{Man}}$, des protéines impliquées ($\text{IIAB}_L^{\text{Man}}$) ou potentiellement impliquées ($\text{IIAB}_H^{\text{Man}}$) dans le transport de plusieurs sucres PTS chez *S. salivarius* (107, 108, 268). Il n'existait, au début de cette étude, aucun clone surproducteur de la protéine $\text{IIAB}_H^{\text{Man}}$. Nous avons donc cloné le gène *manH*, qui code pour $\text{IIAB}_H^{\text{Man}}$, dans un vecteur de surproduction, le plasmide pET-19b, tel que décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (voir section 2.8, page 58). Le plasmide ainsi obtenu, baptisé pDR3 (Fig. 31), a été séquencé sur les deux brins d'ADN afin de s'assurer que le gène *manH* s'était inséré correctement et qu'aucune mutation n'avait eu lieu lors de l'amplification de ce dernier.

```

                                Promoteur T7                                Opérateur lac
1    ...TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCC 60

                                rbs
61    CTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCATCATCATCAT 120
manH                                M G H H H H

                                His-tag                                NdeI
121    CATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATGGGTATC 180
                                H H H H H H S S G H I D D D D K H M G I

                                XhoI
1141 ATTAAGTCAGCTGAAACTAAATTAGCAGAGAAGAAATAATTCTCGAGGATCCGGCTGCTA 1200
                                I K S A E T K L A E K K *

```

Figure 31 : Représentation de la région promotrice codant pour le gène *manH* du plasmide pDR3. En vert, le promoteur T7, site de fixation de l'ARN polymérase du phage T7; en bleu, l'opérateur *lac*, site de fixation du répresseur LacI; en rose, le rbs, le site de fixation du ribosome; en rouge, la séquence codante pour la queue d'histidines et en violet, les sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction employées lors du clonage du gène *manH*.

3.2.1.6 Purification des enzymes recombinantes IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man}

Les protéines IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man} ont été purifiées selon la méthode décrite précédemment à la section 2.9.2. Brièvement, les extraits protéiques solubles ont été purifiés sur une résine d'affinité au nickel suivi d'une filtration sur un gel en utilisant une colonne de Superdex 75 10/300 GL. Le degré de pureté des protéines recombinantes IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man} a été déterminé par SDS-PAGE. Les préparations protéiques ont montré un degré de pureté supérieur à 95% (Fig. 32).

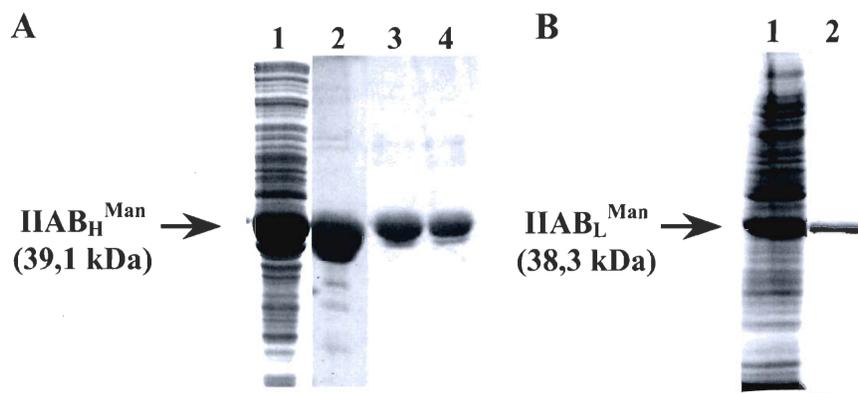


Figure 32 : Analyse par SDS-PAGE des protéines recombinantes IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} de *S. salivarius*. Les protéines ont été séparées sur un gel contenant 12% d'acrylamide. A, puits 1, extrait protéique de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante IIAB_H^{Man}; puits 2, extrait purifié de la protéine recombinante IIAB_H^{Man} après passage sur la colonne d'affinité de Ni-NTA; puits 3 et 4, fractions purifiées sur Ni-NTA de la protéine recombinante IIAB_H^{Man} après passage sur tamis moléculaire Superdex 75 10/300 GL. B, puits 1, extrait protéique de *E. coli* surproduisant la protéine recombinante IIAB_L^{Man}; puits 2, IIAB_L^{Man} purifiée après passage sur Ni-NTA et sur tamis moléculaire Superdex 75 10/300 GL. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

3.2.1.7 Vérification de l'activité des enzymes recombinantes IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man}

Des essais de phosphorylation ont été réalisés avec les enzymes recombinantes IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} afin de s'assurer qu'elles étaient actives (9). Dans un premier temps, les enzymes IIAB^{Man} ont été ajoutées à des mélanges réactionnels composés de PEP^[32P], de EI et de HPr puis, suite à une incubation de 10 min, les mélanges réactionnels ont été fractionnés par SDS-PAGE et les protéines phosphorylées ont été révélées par autoradiographie (voir section 2.10, page 61). Les résultats ont montré que les deux enzymes IIAB^{Man} étaient phosphorylées par HPr(His~P) (Fig. 33, puits 2 et 3). Compte tenu du fait que la phosphorylation des IIAB^{Man} par HPr(His~P) est une réaction réversible, nous avons voulu vérifier si les enzymes recombinantes IIAB^{Man} phosphorylées étaient en mesure de transférer leur groupement phosphoryle à HPr. Dans un premier temps, nous avons procédé à la purification des IIAB^{Man}~P. Pour ce faire l'essai de phosphorylation décrit précédemment a été repris avec les protéines EI et HPr purifiées directement de *S. salivarius*, donc qui ne possédaient pas de queue d'histidines. Ensuite, les enzymes recombinantes IIAB^{Man}~P ont été purifiées des mélanges réactionnels sur une résine d'affinité au nickel (Fig. 33, puits 4 et 6). Finalement, les enzymes purifiées ont été mises

en présence de HPr de *S. salivarius* afin de vérifier si elles étaient en mesure de phosphoryler cette dernière. Les résultats ont montré que les deux enzymes recombinantes $\text{IIAB}^{\text{Man}}\sim\text{P}$ pouvaient phosphoryler HPr (Fig. 33, puits 5 et 7). Ces résultats confirmaient que les enzymes IIAB^{Man} recombinantes pouvaient être réversiblement phosphorylées par $\text{HPr}(\text{His}\sim\text{P})$.

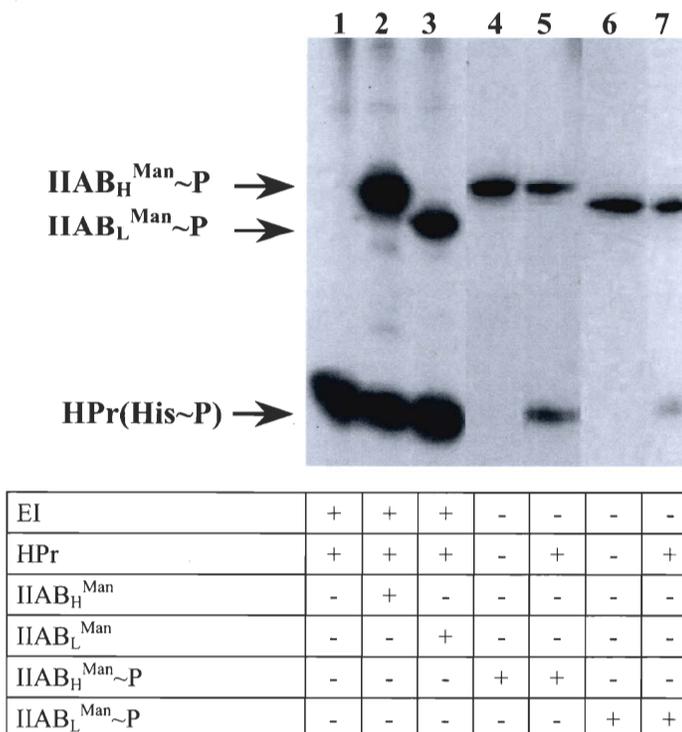


Figure 33 : Vérification de la phosphorylation réversible des enzymes recombinantes IIAB^{Man} . Les essais de phosphorylation ont été effectués en présence de 1 μM de EI, de 5 μM de HPr et de 10 μM de $\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}$ ou $\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}$. La radioactivité spécifique du $\text{PEP}[^{32}\text{P}]$ était de 0,2 $\mu\text{Ci/nmol}$. Puits 1, phosphorylation de HPr par EI; puits 2, phosphorylation de $\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}$ par $\text{HPr}(\text{His}\sim\text{P})$; puits 3, phosphorylation de $\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}$ par $\text{HPr}(\text{His}\sim\text{P})$; puits 4, $\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}\sim\text{P}$ purifiée; puits 5, phosphorylation de HPr par $\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}\sim\text{P}$; puits 6, $\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}\sim\text{P}$ purifiée; puits 7, phosphorylation de HPr par $\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}\sim\text{P}$. Les protéines marquées par l'isotope ^{32}P ont été révélées par autoradiographie.

Pour s'assurer que les enzymes IIAB^{Man} étaient en mesure de transférer leur groupement phosphorylé à des sucres, un essai de phosphorylation du mannose couplé à la LDH a été effectué. Brièvement, l'expérience a été réalisée comme suit : des membranes de *S. salivarius* ont été ajoutées à un mélange réactionnel contenant du EI, de la LDH, du HPr, l'une ou l'autre des enzymes IIAB^{Man} , du NADH et du mannose. En présence des membranes, contenant les domaines membranaires IIC^{Man} et IID^{Man} , le mannose est phosphorylé par $\text{IIAB}_\text{L}^{\text{Man}}$ ou $\text{IIAB}_\text{H}^{\text{Man}}$. Il en résulte un cycle où chaque molécule de

mannose phosphorylé cause la transformation d'une molécule de PEP en pyruvate. La vitesse de la réaction peut être mesurée en suivant l'oxydation du NADH suite à la transformation du pyruvate en lactate par la LDH. Des expériences réalisées avec His₁₀-IIAB_L^{Man} ont montré que cette protéine était en mesure de transférer son groupement phosphorylé à du mannose. En effet, après à une incubation de 10 min à 37°C, 90 nmol de mannose ont été phosphorylés par His₁₀-IIAB_L^{Man}. Globalement, l'ensemble des résultats obtenus ont montré que les protéines recombinantes IIAB^{Man} étaient en mesure d'effectuer les fonctions qui leurs sont associées.

3.2.2 Phosphorylation des EII^{Man} par HPr(Ser-P)(His~P)

3.2.2.1 Phosphorylation des protéines IIAB^{Man} du PTS mannose de *S. salivarius* par HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P)

Les protéines du PTS IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man} sont toutes deux phosphorylées par HPr(His~P) (269). Cependant, la participation de ces protéines dans le transport des sucres n'a été démontrée que pour IIAB_L^{Man} (269, 372). Afin de déterminer si ces protéines du PTS pouvaient être phosphorylées par HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P), les phosphoprotéines produites suite à une incubation de 10 min à 10°C des protéines recombinantes purifiées IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} en présence de EI, de PEP[³²P] et de HPr, HPr(Ser-P) ou HPr(S46D), ont été séparées par SDS-PAGE, puis détectées en utilisant un phosphorimager (Fig. 34). Les résultats montrent que toutes les formes de HPr utilisées étaient, après avoir été phosphorylées sur leur résidu His₁₅ par EI, en mesure de transférer leur groupement phosphorylé aux deux formes de la protéine IIAB^{Man} de *S. salivarius*.

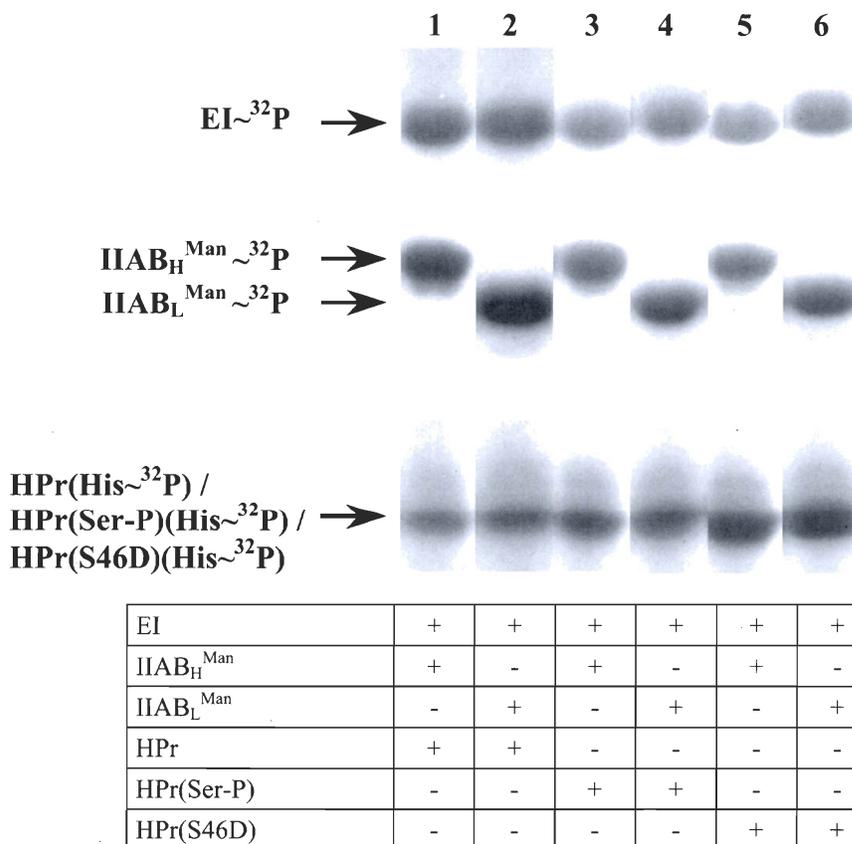


Figure 34 : Phosphorylation de IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P). La phosphorylation de 10 μ M de IIAB_H^{Man} ou de IIAB_L^{Man} par approximativement 5 μ M de HPr(His~P), de HPr(Ser-P)(His~P) ou de HPr(S46D)(His~P) a été réalisée à 10°C en présence de 2 μ M de EI et 1 mM de PEP[³²P]. Les échantillons ont été retirés après 10 min. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les phosphoprotéines ont été révélées par exposition à un Phosphorimager (Fuji BAS1000). Puits 1, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_H^{Man} avec EI et HPr; puits 2, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_L^{Man} avec EI et HPr; puits 3, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_H^{Man} avec EI et HPr(Ser-P); puits 4, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_L^{Man} avec EI et HPr(Ser-P); puits 5, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_H^{Man} avec EI et HPr(S46D); puits 6, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_L^{Man} avec EI et HPr(S46D).

3.2.2.2 Vitesse de phosphorylation de IIAB_L^{Man} et IIAB_H^{Man} par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P)

Pour comparer la vitesse de transfert du groupement phosphorylé des différentes formes de HPr phosphorylées sur le résidu His₁₅ aux enzymes recombinantes IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man}, nous avons tenté de déterminer la vitesse initiale de phosphorylation en mesurant les quantités de P~IIAB_H^{Man} et P~IIAB_L^{Man} produites à 10°C après de courts temps

d'incubation. Compte tenu que seulement une fraction des HPr(Ser-P) et HPr(S46D) étaient transformées en HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P) lorsqu'elles étaient incubées en présence de EI et de PEP[³²P], les concentrations de HPr(Ser-P) et HPr(S46D) ont été ajustées de sorte que les concentrations finales de HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P) soient similaires à celle de HPr(His~P), soit approximativement 5 μ M. Dans ces conditions, la réaction atteignait l'équilibre en moins de 5 s avec toutes les formes de HPr testées. L'essai a donc été repris à 4°C pour tenter de ralentir suffisamment la vitesse de réaction pour être en mesure de calculer les vitesses initiales. Cependant, même à 4°C, le transfert des groupements phosphorylés de HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P) aux enzymes recombinantes IIAB_H^{Man} et IIAB_L^{Man} était trop rapide pour permettre la mesure des vitesses initiales (Fig. 35). En présence de HPr(His~P), les résultats montrent que la presque totalité des enzymes IIAB^{Man} (approximativement 10 μ M) était phosphorylée. En revanche, en présence de HPr(Ser-P)(His~P) ou de HPr(S46D)(His~P), le niveau de phosphorylation des enzymes IIAB^{Man} chute à près de 30%. Cette différence importante pourrait être expliquée par le fait que la phosphorylation de HPr par EI est très rapide ce qui devrait permettre de garder la concentration de HPr(His~P) constante tout au long des réactions de phosphorylation des EI^{Man}. D'autre part, comme la phosphorylation de HPr(Ser-P) et de HPr(S46D) par EI est environ de 1 000 à 5 000 fois plus lente que celle de HPr (48, 70, 72, 292, 293), on peut supposer qu'elle est également amplement plus lente que le transfert du groupement phosphorylé de HPr(Ser-P)(His~P) ou de HPr(S46D)(His~P) vers les IIAB^{Man}. En conséquence, les niveaux de HPr(Ser-P)(His~P) ou de HPr(S46D)(His~P) doivent diminuer rapidement au cours de la réaction, empêchant une phosphorylation complète des protéines IIAB^{Man}.

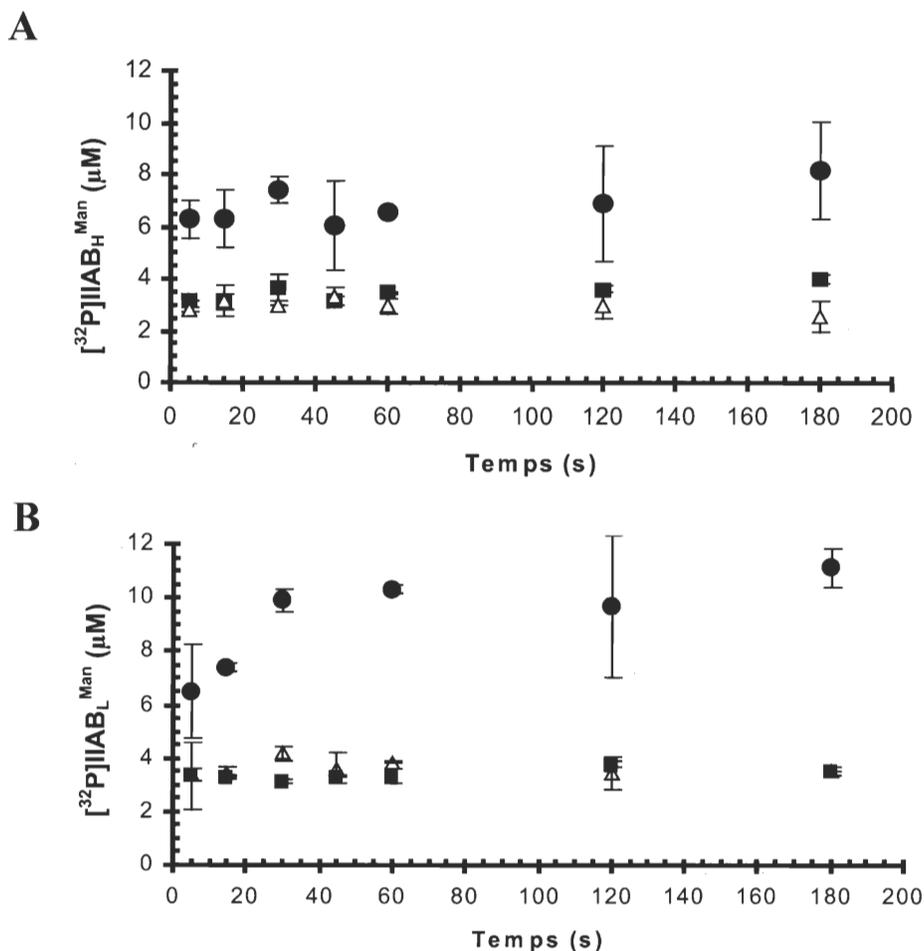


Figure 35 : Vitesses de phosphorylation de IIAB_H^{Man} et de IIAB_L^{Man} de *S. salivarius* par HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P). À la suite d'une incubation de 45 min à 37°C du mélange réactionnel afin de permettre la synthèse d'environ 5μM de HPr(His~P), de HPr(Ser-P)(His~P) et de HPr(S46D)(His~P), les solutions étaient placées à 4°C pour 5 min, puis l'enzyme IIAB^{Man} était ajoutée à une concentration finale de 10 μM. Des aliquotes ont été retirées à différents intervalles, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les phosphoprotéines ont été révélées par autoradiographie. Les bandes correspondantes aux enzymes [32P]IIAB_H^{Man} et [32P]IIAB_L^{Man} ont été excisées et la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (LS 6500 multi-purpose scintillation counter, Beckman Coulter). Chaque point correspond à la moyenne de deux valeurs provenant de deux expériences indépendantes. Les barres indiquent l'écart type. A, (●) phosphorylation de IIAB_H^{Man} par HPr(His~P); (■) phosphorylation de IIAB_H^{Man} par HPr(Ser-P)(His~P); (Δ) phosphorylation de IIAB_H^{Man} par HPr(S46D)(His~P). B, (●) phosphorylation de IIAB_L^{Man} par HPr(His~P); (■) phosphorylation de IIAB_L^{Man} par HPr(Ser-P)(His~P); (Δ) phosphorylation de IIAB_L^{Man} par HPr(S46D)(His~P).

3.2.3 Phosphorylation de la glycérol kinase de *E. casseliflavus* par HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P)

La régulation de l'activité de la glycérol kinase chez certaines bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C s'effectue *via* la phosphorylation réversible, par la protéine HPr(His~P), d'un résidu His conservé (70). Afin de déterminer si la forme doublement phosphorylée de HPr était en mesure de transférer son groupement phosphorylé à la GlpK de *E. casseliflavus*, nous avons d'abord vérifié que les protéines HPr de *S. salivarius*, *B. subtilis* et *E. casseliflavus* étaient en mesure de phosphoryler GlpK. Soulignons, qu'à ce jour, les études de phosphorylation de la GlpK de *E. casseliflavus* ont été effectuées en présence de HPr de *B. subtilis* (50) et qu'aucun résultat n'a encore été publié démontrant que le HPr de *E. casseliflavus* était en mesure de phosphoryler sa propre GlpK. L'enzyme recombinante GlpK a été incubée à 37°C en présence des HPr et de PEP[³²P]. Les différents HPr ont aussi été mis en présence de IIAB_L^{Man} afin de s'assurer que toutes les protéines HPr étaient en mesure de transférer un groupement phosphorylé. Après séparation des protéines par SDS-PAGE, les phosphoprotéines ont été détectées par autoradiographie (Fig. 36). Une phosphoprotéine migrant à la position attendue pour la P~GlpK pouvait être observée dans les mélanges réactionnels contenant les protéines HPr(His~P) de *B. subtilis* et *S. salivarius* mais non dans celui contenant le HPr de *E. casseliflavus* (Fig. 36, puits 10).

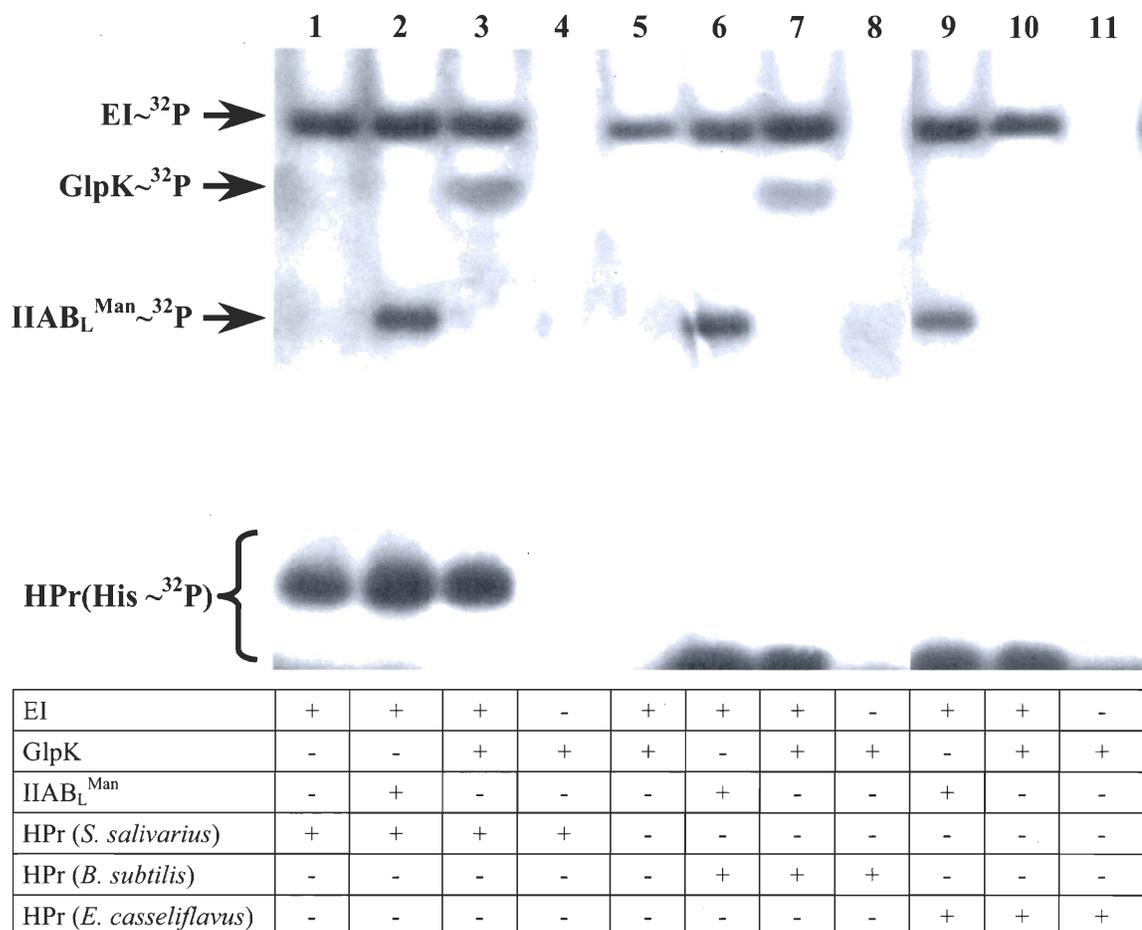


Figure 36 : Phosphorylation des enzymes IIAB_L^{Man} de *S. salivarius* et GIpK de *E. casseliflavus* par HPr(His~P). Les milieux réactionnels ont été incubés 2h à 37°C en présence de PEP[³²P] à 30 μmol/μCi. Les concentrations protéiques étaient de 1 μM pour EI, 30 μM pour la GIpK, 10 μM pour IIAB_L^{Man} et 10 μM pour les HPr. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les phosphoprotéines ont été révélées par autoradiographie. Puits 1, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de HPr (*S. salivarius*) avec EI; puits 2, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de IIAB_L^{Man} avec EI et HPr (*S. salivarius*); puits 3, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de GIpK avec EI et HPr (*S. salivarius*); puits 4, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de GIpK avec HPr (*S. salivarius*); puits 5, phosphoprotéines produites suite à l'incubation de GIpK avec EI (*S. salivarius*); puits 6-8 répétition des puits 2-4 mais en présence de HPr de *B. subtilis*; puits 9-11 répétition des puits 2-4 mais en présence de HPr de *E. casseliflavus*.

De manière à déterminer si HPr(Ser-P)(His~P) était en mesure de phosphoryler l'enzyme GIpK de *E. casseliflavus*, cette dernière a été incubée en présence de HPr(His~³²P) et HPr(Ser-P)(His~³²P) de *S. salivarius* et *E. casseliflavus*. La synthèse et la purification de HPr(Ser-P) de *E. casseliflavus* ont été effectuées selon la procédure décrite précédemment (voir section 2.12, page 63). Les milieux réactionnels ont été incubés pendant 60 min à

37°C. Après séparation des protéines par SDS-PAGE, les phosphoprotéines ont été détectées par autoradiographie (Fig. 37). Alors qu'il est possible d'observer une phosphoprotéine migrant à la hauteur prévue pour la P~GlpK en présence de HPr(His~P) de *S. salivarius*, aucune phosphoprotéine n'a été détectée dans les mélanges réactionnels contenant HPr(His~P) de *E. casseliflavus*, ni dans ceux contenant les protéines HPr(Ser-P)(His~P) de *S. salivarius* et *E. casseliflavus*. L'absence de phosphorylation de la GlpK par HPr(Ser-P)(His~P) ne résulte pas en l'incapacité de cette forme de HPr à transférer son groupement phosphorylé. En effet, les formes doublement phosphorylées de HPr de *S. salivarius* et *E. casseliflavus* étaient en mesure de phosphoryler l'enzyme IIAB_L^{Man} (Fig. 37B et D, puits 1). L'ensemble des résultats indique que, sous la forme doublement phosphorylée, les protéines HPr de *S. salivarius* et *E. casseliflavus* ne sont pas en mesure de transférer leur groupement phosphorylé à la GlpK. Fait surprenant, nous avons été incapable de montrer que le HPr de *E. casseliflavus* pouvait transférer son groupement phosphorylé à la GlpK. Ces résultats suggèrent que la GlpK de *E. casseliflavus* n'est pas activée par phosphorylation contrairement à ce qui a été observé chez *E. faecalis* (69). Le tout sera traité plus longuement à la section 5.1.4.2.

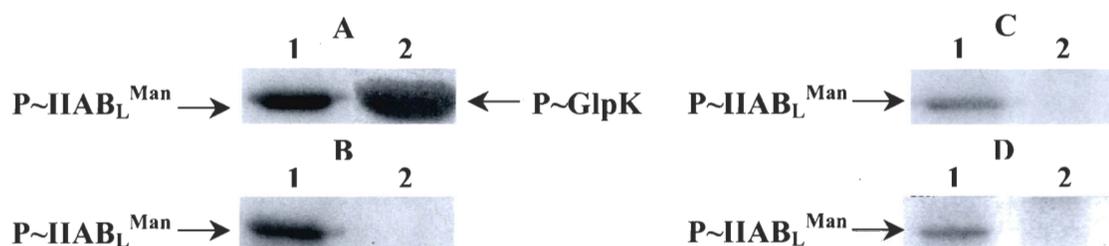


Figure 37 : Phosphorylation des enzymes IIAB_L^{Man} de *S. salivarius* et GlpK de *E. casseliflavus* par HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P). Les essais étaient faits en présence de PEP[³²P] à 30 μmol/μCi, 2h à 37°C. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les phosphoprotéines ont été révélées par autoradiographie. Puits A1, 1 μM de EI, 10 μM de HPr (*S. salivarius*) et 10 μM de IIAB_L^{Man}; puits A2, 1 μM de EI, 10 μM de HPr (*S. salivarius*) et 30 μM de GlpK; puits B1 et B2, répétitions des puits 1 et 2 du panneau A mais en présence de 20 μM de HPr(Ser-P) de *S. salivarius*. Les panneaux C et D sont identiques aux panneaux A et B à l'exception que les HPr et HPr(Ser-P) provenaient de *E. casseliflavus*.

3.3 Résumé des principaux résultats du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons voulu établir la présence et les rôles de HPr(Ser-P)(His~P) chez certaines bactéries de la classe des *Bacilli*. Dans un premier temps, deux techniques

distinctes ont été utilisées afin de mesurer les différentes formes de HPr : l'immunoélectrophorèse croisée et l'immunobuvardage de type Western. La présence de HPr doublement phosphorylé a été observée chez tous les streptocoques et lactocoques étudiés et les résultats obtenus par immunoélectrophorèse croisée présentent généralement des proportions faibles de HPr libre et de HPr(His~P) alors que le contraire était observé lors des immunobuvardages de type Western. L'acidification du milieu intracellulaire serait nécessaire au maintien des différentes formes de HPr pendant la préparation des extraits cellulaires en inactivant, entre autres, la HPrK/P et l'EI. De même, nous avons observé qu'il était possible de limiter la dégradation des différentes phospho-formes de HPr en diminuant la période de la préparation de l'extrait cellulaire. Enfin, HPr(Ser-P)(His~P) de *S. salivarius* serait en mesure de phosphoryler efficacement les enzymes IIAB^{Man} de *S. salivarius* ainsi que la GlpK de *E. casseliflavus*. En revanche, en système homologue, le HPr doublement phosphorylé de *E. casseliflavus* ne serait pas en mesure de phosphoryler GlpK.

Chapitre 4

HPr(His~P) chez *S. salivarius*

4.1 Rôle de HPr(His~P) chez les streptocoques et les lactocoques

Chez les streptocoques, HPr(His~P) est nécessaire au transport des sucres PTS et dans le contrôle du transport du lactose, un sucre non-PTS, par phosphorylation réversible du transporteur LacS (128, 202). Chez certaines bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, il a aussi été démontré que HPr(His~P) phosphoryle certains régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD (337). En revanche, bien que la présence d'un homologue de LicT, un régulateur transcriptionnel possédant des domaines PRD, ait été rapporté chez *S. mutans*, aucune preuve n'a été rapportée pour démontrer que ce dernier est contrôlé par HPr(His~P) (60) comme cela a été observé chez *B. subtilis*. Cependant, l'analyse des génomes des streptocoques et lactocoques montre la présence de régulateurs transcriptionnels à domaines PRD chez *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *S. suis*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *L. lactis* ssp *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* et *Lactococcus raffinolactis* (www.ebi.ac.uk). Ceci suggère que HPr(His~P) pourrait participer, *via* la phosphorylation et déphosphorylation de certains

domaines PRD, à la régulation de gènes chez les streptocoques. Avec l'objectif de déterminer l'importance de HPr(His~P) en tant que régulateur de la transcription chez les streptocoques, l'analyse, sur une base comparative, des protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et de la souche G71, un mutant de *S. salivarius* muté sur le gène *ptsI* codant pour EI, a été faite à partir de cultures prises en phase exponentielle et stationnaire de croissance et ce, à la fois sur les fractions solubles et membranaires.

4.1.1 Caractérisation du mutant *S. salivarius* G71

S. salivarius G71 est un mutant spontané qui a été isolé par culture de la souche sauvage, *S. salivarius* ATCC 25975, sur un milieu contenant du galactose et du 2-désoxyglucose, un analogue toxique et non métabolisable du glucose (108). La mutation de la souche G71 consiste en une délétion d'une base en position 166 du gène *ptsI* causant un décalage dans le cadre de lecture, ce qui introduit un codon d'arrêt (TGA) prématuré (Fig. 38). En conséquence, le mutant G71 ne produit pas de EI (108).

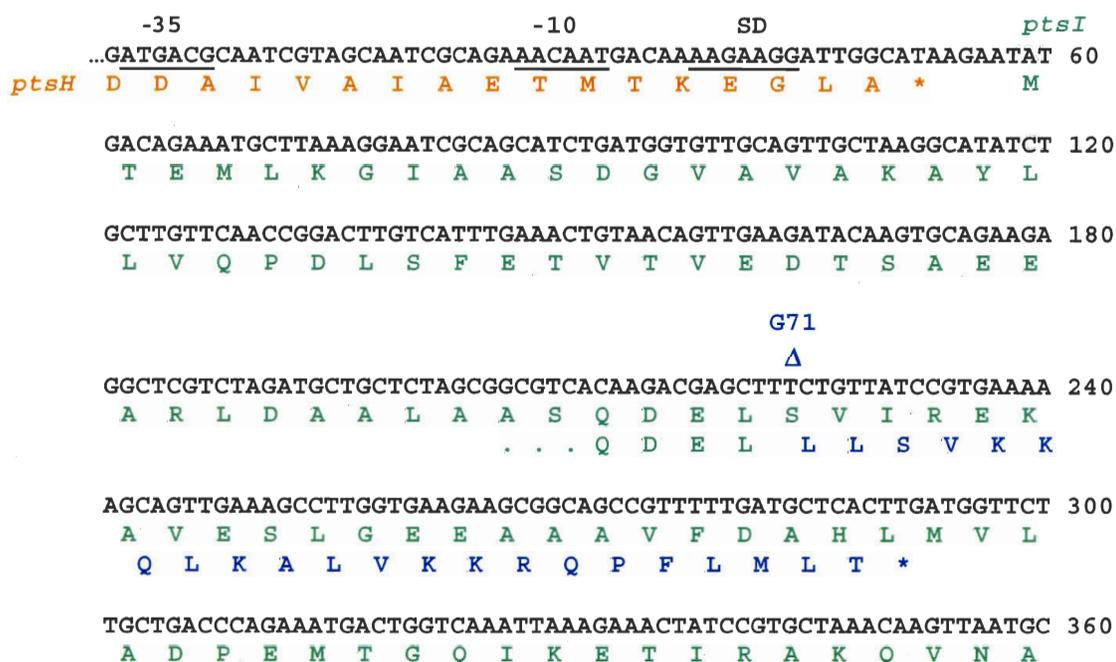


Figure 38 : Mutation du gène *ptsI* chez *S. salivarius* G71. Le Δ indique la base absente chez le mutant G71 alors que l'astérisque représente la position d'un codon d'arrêt.

Dans le but de confirmer que ce mutant était incapable de synthétiser du EI, des essais de phosphorylation *in vitro* de HPr aux dépens du PEP ont été effectués avec des extraits cellulaires de *S. salivarius* G71. Les résultats ont confirmé que le mutant G71 ne possédait

pas de EI actif (Fig. 39). Ainsi, la mutation *ptsIΔ166* cause un arrêt permanent de la cascade de phosphorylation du PTS prévenant l'autophosphorylation initiale de EI aux dépens du PEP.

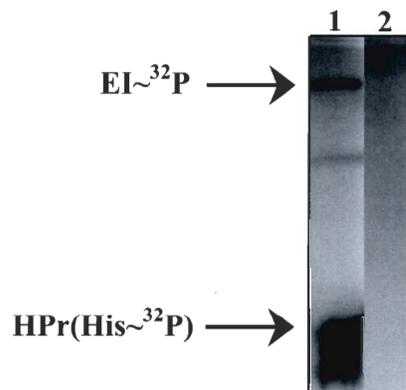


Figure 39 : Essai de phosphorylation de HPr de *S. salivarius* aux dépens du PEP en présence d'extraits cytoplasmiques de *S. salivarius* ATCC 25975 (puits 1) et de *S. salivarius* G71 (puits 2). Les essais ont été faits en présence de PEP[^{32}P] à $30 \mu\text{mol}/\mu\text{Ci}$, 30 min à 37°C . Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les phosphoprotéines ont été révélées par autoradiographie.

4.1.1.1 Détermination des séquences de l'opéron *ptsHI* et du gène *ccpA* chez *S. salivarius* G71

Il a été démontré que des mutations au niveau de la région promotrice de l'opéron *ptsHI* chez *S. salivarius* peuvent réduire de façon importante la transcription de l'opéron *ptsHI*, avoir un impact sur la vitesse de croissance des bactéries en présence de sucres PTS et non-PTS, et causer la dérépression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des sucres (354). De même, la présence de mutations au niveau du gène codant pour le régulateur transcriptionnel CcpA pourrait résulter en des variations de l'expression de certains gènes (151). Nous avons donc procédé à la détermination de la séquence de ces gènes chez le mutant G71 afin de s'assurer de leur intégrité. Aucune mutation n'a été observée au niveau du promoteur de l'opéron *ptsHI* ni au niveau du gène *ccpA*.

4.1.1.2 Caractérisation de la croissance chez *S. salivarius* G71

Dans le but de s'assurer que la mutation *ptsIΔ166* chez *S. salivarius* n'influçait pas les capacités du mutant à croître en présence de sucre non-PTS, la détermination des temps de

génération en présence de sucres PTS et non PTS a été effectuée (Tableau 8). Les temps de génération étaient similaires en présence de mélibiose et de lactose alors qu'ils étaient légèrement plus longs en présence de galactose et de raffinose, tous ces sucres étant des sucres non-PTS. Aucune croissance n'a été observée en présence de maltose, de mannose, de glucose, de saccharose et de fructose.

Tableau 8 : Temps de génération de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71

Sucre (0,2%)	Temps de génération (min) à 37°C ^a	
	ATCC 25975	G71
Mélibiose	34 ± 1	34 ± 2
Lactose	31 ± 1	29 ± 1
Galactose	27 ± 1	34 ± 2
Raffinose	31 ± 1	36 ± 3
Maltose	27 ± 2	ND ^b
Glucose	28 ± 2	ND
Mannose	30 ± 2	ND
Saccharose	33 ± 2	ND
Fructose	25 ± 1	ND

^a Les valeurs présentées proviennent de la moyenne de trois expériences ± écart type.

^b ND, aucune croissance détectée.

4.1.2 Détermination de la présence d'un PTS maltose chez *S. salivarius*

L'absence de croissance sur maltose chez *S. salivarius* G71 a soulevé la question à savoir si ce sucre était transporté dans la cellule *via* le PTS chez *S. salivarius*. En effet, chez les streptocoques, il existe plusieurs modes de transport du maltose : ce dernier est transporté par le PTS chez *S. mutans* et *S. bovis* (226, 396) alors qu'il emprunte des voies de transport indépendante du PTS chez *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* (257, 327). Afin de déterminer si le maltose était un sucre PTS chez *S. salivarius*, un essai de phosphorylation couplé à la LDH (voir section 2.17, page 67) a été effectué. Pour limiter l'interférence causée par un haut niveau d'activité PTS-glucose, le mutant *S. salivarius* A37 a été employé compte tenu qu'il est incapable de produire IIAB_L^{Man}, une protéine clé du PTS glucose/mannose (195). Ainsi, en présence de membranes provenant de cellules cultivées en présence de maltose, l'activité EII-maltose était élevée alors qu'en présence de membranes de cellules cultivées en présence de galactose, un sucre non-PTS, l'activité EII-maltose était plus faible (Tableau 9). Ces résultats suggèrent que le maltose est transporté par le PTS chez *S. salivarius*.

Tableau 9 : Activité EII pour le maltose et le glucose en présence de membranes de *S. salivarius* A37

Sucre (0,4%)	Activité EII ^a	
	Maltose	Glucose
Maltose	320,6	126,8
Galactose	201,6	54,7

^a Les valeurs présentées sont exprimées en nmol de sucre phosphorylé \times min⁻¹ \times mg⁻¹ d'extrait membranaire.

4.1.3 Détermination des différentes formes de HPr chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71

Tel que décrit précédemment, les différentes formes de HPr participent à divers mécanismes de régulation au niveau de l'expression des gènes ou de l'activité de certaines enzymes et transporteurs. Il était donc important de connaître les concentrations de ces différentes formes de HPr chez le mutant G71 afin d'être en mesure de bien interpréter les résultats à venir. Compte tenu qu'il était prévu de déterminer les protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 pour des cellules recueillies en phase exponentielle et stationnaire de croissance, les niveaux cellulaires des différentes formes de HPr ont été déterminés pour ces deux conditions.

Les extraits protéiques solubles ont été préparés à partir de cellules récoltées en phase exponentielle et stationnaire de croissance et traitées à la gramicidine D. Les différentes formes de HPr ont été mesurées par immunoélectrophorèse croisée à l'aide d'anticorps dirigés contre le HPr de *S. salivarius*. L'analyse de l'aire sous les courbes des différents pics provenant des extraits chauffés ou non a permis de mesurer les proportions des différentes formes de HPr présentes dans les extraits (Fig. 40). Enfin, une courbe étalon, obtenue d'une dilution séquentielle de HPr purifiée de *S. salivarius*, a permis de déterminer la concentration de HPr présente dans les différents extraits analysés.

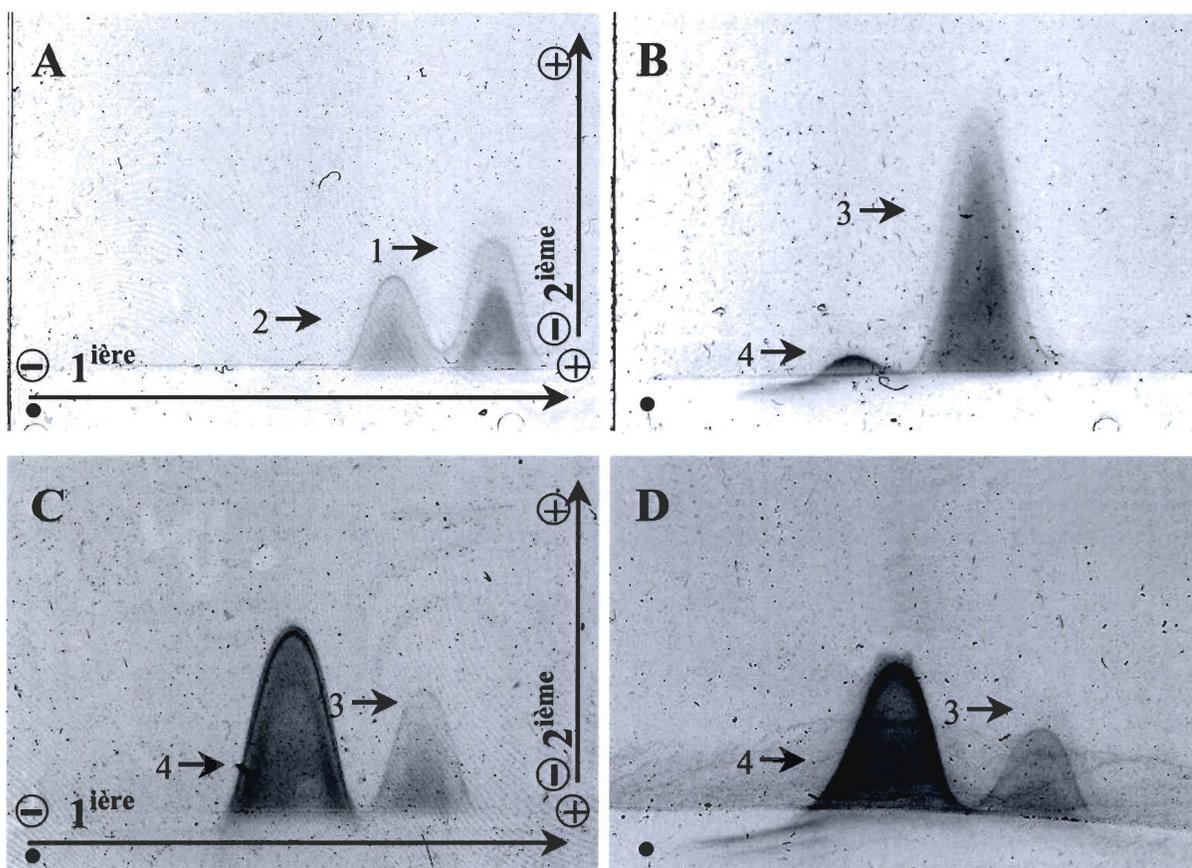


Figure 40 : Détermination des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71. A, Souche sauvage récoltée en phase exponentielle de croissance, B, même extrait qu'en A, traité 5 min à 100°C. C, Souche mutante récoltée en phase exponentielle de croissance, D même extrait qu'en C, traité 5 min à 100°C. Les chiffres représentent les immunoprécipités correspondant à 1, HPr(Ser-P)(His~P); 2, HPr(His~P) et/ou HPr(Ser-P); 3, HPr(Ser-P); 4, HPr libre. Les flèches indiquent la direction de la migration au cours de la première (flèche horizontale) et de la deuxième (flèche verticale) électrophorèse. Le cercle noir correspond au point d'initiation de la première électrophorèse. Les arcs de précipitation ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie.

Les extraits cellulaires ont été obtenus de cellules qui ont poussé à 37°C en présence de mélibiose. Cette source d'énergie a été choisie compte tenu du fait que la croissance de G71 sur mélibiose n'était pas affectée par la mutation *ptsIA166* (voir Tableau 8, page 105). En phase exponentielle de croissance, des niveaux similaires de HPr(Ser-P) ont été observés chez les deux souches alors que, tel qu'attendu, HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P) étaient absents chez *S. salivarius* G71. Enfin, dans ces conditions, la souche mutée, contrairement à la souche parentale, produit de fortes quantités de HPr libre. En phase stationnaire de croissance, seule la protéine HPr, sous la forme non-phosphorylée, a été

observée chez la souche mutante (Tableau 10) alors que la souche parentale présentait en plus de fortes quantités de HPr(His~P). Globalement, il a été observé que la souche *S. salivarius* G71 synthétisait de 20% à 30% moins de HPr que la souche parentale.

Tableau 10 : Proportions des différentes formes de HPr chez *S. salivarius* 25975 et le mutant G71 mesurées par immunoelectrophorèse croisée

Organisme	Sucre	Concentration cellulaire de HPr ^a				Total HPr ^b
		HPr	HPr(His~P)	HPr(Ser-P)	HPr(His~P)(Ser-P)	
Phase exponentielle						
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	Glucose	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,7	29,9 ± 6,2	23,0 ± 7,1	55,5 ± 2,1
	Mélibiose	0,3 ± 0,3	1,6 ± 0,4	10,6 ± 3,4	23,9 ± 3,3	36,3 ± 2,9
<i>S. salivarius</i> G71	Mélibiose	16,1 ± 1,3	ND ^c	9,5 ± 1,3	ND	25,6 ± 0,8
Phase stationnaire						
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	Mélibiose	87,5 ± 9,2	28,5 ± 3,9	ND	ND	116,1 ± 6,0
<i>S. salivarius</i> G71	Mélibiose	88,5 ± 4,6	ND	ND	ND	88,5 ± 4,6

^a La proportion des différentes formes de HPr est exprimée en µg de HPr par mg de protéines solubles. Les valeurs (± écart type) sont les moyennes de trois dosages différents effectués à partir d'extraits provenant de cultures différentes. Les cultures en phase exponentielle de croissance ont été faites en présence de 0,4% (p/v) de sucre alors qu'en phase stationnaire de croissance, la concentration en sucre était de 0,2% (p/v).

^b Les tests-T de Student ont démontré que ces valeurs sont toutes significativement différentes à p<0,05.

^c ND non détecté.

4.1.4 Analyse de type Northern

Les résultats obtenus par immunoelectrophorèse croisée ont montré, au niveau des quantités protéiques, des variations plus ou moins importantes au niveau de la quantité totale de HPr entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Afin de déterminer si ces différences résultent d'une variation au niveau de la transcription, l'étude des transcrits de l'opéron *pts* a été faite.

4.1.4.1 Dosage des ARN messagers de l'opéron *pts* chez les deux souches de *S.*

salivarius

Lors de l'analyse des différentes formes de HPr chez la souche sauvage et le mutant G71, il a été observé que la quantité totale de HPr augmente de façon importante entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. De plus, on observe une diminution de la quantité totale de HPr de près de 30% entre la souche sauvage et le mutant en phase exponentielle de croissance. Afin de vérifier si les différences observées au niveau des quantités totales de HPr entre les deux souches de *S. salivarius* résultait d'une diminution

du taux de transcription de l'opéron *pts*, des analyses de type Northern ont été réalisées avec des ARN totaux de *S. salivarius* ATCC 25975 et G71 isolés de cellules recueillies en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Des résultats antérieurs ont montré que la transcription de l'opéron *pts* de *S. salivarius*, constitué des gènes *ptsH* et *ptsI*, génère trois transcrits d'ARNm de tailles différentes, soit un transcrit de 0,5 kb, couvrant *ptsH*, et deux transcrits de 2,1 et 2,3 kb, couvrant *ptsHI* (Fig. 41) (99). L'analyse comparative, par Northern, des transcrits d'ARNm isolés de la souche sauvage de *S. salivarius* et du mutant G71 récoltés en phase exponentielle de croissance, a montré une diminution par un facteur cinq du transcrit de 0,5 kb chez le mutant G71 alors que le transcrit de 2,3 kb était absent chez le mutant. En revanche, le transcrit de 2,1 kb était deux fois plus intense chez le mutant que la somme des transcrits de 2,1 et 2,3 kb chez la souche sauvage (Fig. 42). Enfin, bien que nous ayons observé des quantités significativement supérieures de HPr après croissance de la souche sauvage en présence de glucose par rapport à sa croissance sur mélibiose (Tableau 10), aucune différence significative n'a été observée au niveau des transcrits d'ARNm. Chez les cellules présent en phase stationnaire de croissance, on observe une diminution des transcrits par un facteur vingt chez *S. salivarius* G71 par rapport à la souche ATCC 25975. Ces résultats ont été obtenus en triplicata à partir d'ARN isolé à partir de cellules provenant de trois cultures différentes.

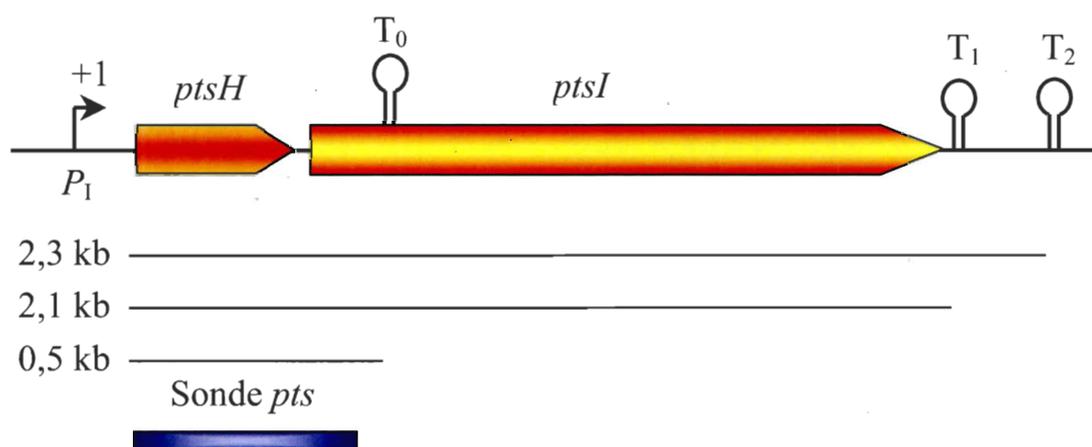
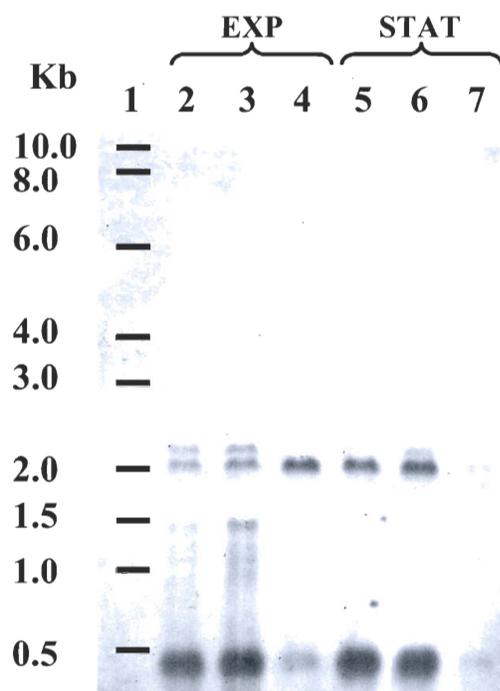


Figure 41 : Représentation schématique de l'opéron *pts*. Le point d'initiation de la transcription du promoteur P_1 est indiqué (+1) ainsi que la position relative des terminateurs (T_0 , T_1 et T_2). La taille des transcrits attendus ainsi que la zone d'appariement de la sonde *pts* sont également indiquées. Figure tirée de Gagnon *et al.* (99).

Globalement, nous observons, pour les cultures sur mélibiose, une légère augmentation des niveaux des ARNm chez *S. salivarius* ATCC 25975 en cours de croissance. Ce résultat diffère largement avec celui observé pour le mutant G71 où une diminution importante des ARNm a été observée entre les cultures prises en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Curieusement, cette baisse de transcrits chez le mutant ne résulte pas en une baisse importante de HPr dans la cellule (Tableau 10).



<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	+	+	-	+	+	-
<i>S. salivarius</i> G71	-	-	+	-	-	+
Glucose	+	-	-	+	-	-
Mélibiose	-	+	+	-	+	+

Figure 42 : Analyse de type Northern des ARN totaux de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 à l'aide d'une sonde spécifique à *ptsH*. À l'exception du marqueur de taille d'ARN, où 3 µg ont été déposés, 2 µg des ARN totaux ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose en présence de formaldéhyde puis transférés sur une membrane de nylon chargée positivement. Puits 1, marqueur de taille d'ARN; puits 2, ARN totaux de *S. salivarius* ATCC 25975 isolés de bactéries recueillies en phase exponentielle de croissance en présence de glucose; puits 3, ARN totaux de *S. salivarius* ATCC 25975 isolés de bactéries recueillies en phase exponentielle de croissance en présence de mélibiose; puits 4, ARN totaux de *S. salivarius* G71 isolés de bactéries recueillies en phase exponentielle de croissance en présence de mélibiose; puits 5 à 7, répétition des puits 2 à 4 excepté que les ARN totaux provenaient de bactéries recueillies en phase stationnaire de croissance. Les transcrits ont été révélés par autoradiographie. EXP et STAT : ARN extrait de cellules cultivées en phase exponentielle et stationnaire de croissance, respectivement.

4.1.5 Analyse des protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et G71

Afin de déterminer si l'expression de certains gènes étaient contrôlés par HPr(His~P) chez *S. salivarius*, nous avons procédé à l'analyse des protéomes des souches ATCC 25975 et G71 recueillies en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Essentiellement, ce type d'analyse consiste en une préparation d'extrait cellulaire soluble ou membranaire et de la séparation des protéines de ces extraits en fonctions de deux paramètres : leur pI et leur masse moléculaire. Dans le but de limiter la dégradation des protéines, les extraits cellulaires, additionnés d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, ont été soumis immédiatement à une focalisation isoélectrique avant d'être congelés à -80°C. Enfin, les protéines, préalablement séparées en fonction de leur pI, ont été séparées par SDS-PAGE.

4.1.5.1 Analyse protéomique de *S. salivarius* récoltée en phase exponentielle de croissance

L'analyse comparative a été effectuée à partir de profils protéiques issus d'au moins quatre cultures faites sous les mêmes conditions pour chacune des souches testées. De plus, les extraits protéiques solubles et membranaires ont été analysés séparément (Fig. 43). L'identification des protéines, révélées par coloration au nitrate d'argent, et l'analyse de ces dernières ont été effectuées *in silico* (voir section 2.18, page 67). Ces travaux ont permis d'identifier chez le mutant G71, en plus de l'enzyme I qui est absente, six protéines dont les niveaux, en comparaison avec ceux déterminés chez la souche parentale, variaient par un facteur d'au moins deux. Ainsi, quatre protéines étaient sous exprimées chez la souche mutante alors que deux étaient présentes en plus grandes quantités. Ces protéines ont été excisées du gel afin d'être analysées par spectrométrie de masse LC/MS/MS (voir section 2.18, page 67). Des six échantillons ainsi étudiés, cinq protéines ont pu être identifiées (Tableau 11). Seule une protéine sous-exprimée chez le mutant G71 et présentant une masse moléculaire de 36,2 kDa et un pI de 4,5 n'a pu être identifiée.

Le faible nombre de protéines différenciellement exprimées en phase exponentielle de croissance peut s'expliquer par le fait que les quantités de HPr(His~P), bien que nulle chez le mutant G71, sont également très faibles chez la souche parentale durant la phase

exponentielle de croissance. En effet, dans ces conditions, HPr(His~P) représente moins de 5% des HPr totaux. Cependant, comme les deux souches produisent des quantités similaires de HPr(Ser-P), il semblerait que les gènes codant pour les protéines identifiées au Tableau 11 soient contrôlés par HPr(His~P), et que de faibles quantités de cette forme de HPr soient suffisantes pour réprimer ou activer leur expression. Cependant, les résultats ne permettent pas d'exclure un rôle de HPr(Ser-P)(His~P), une forme de HPr absente chez le mutant G71 mais qui représente 65% du HPr total chez la souche parentale.

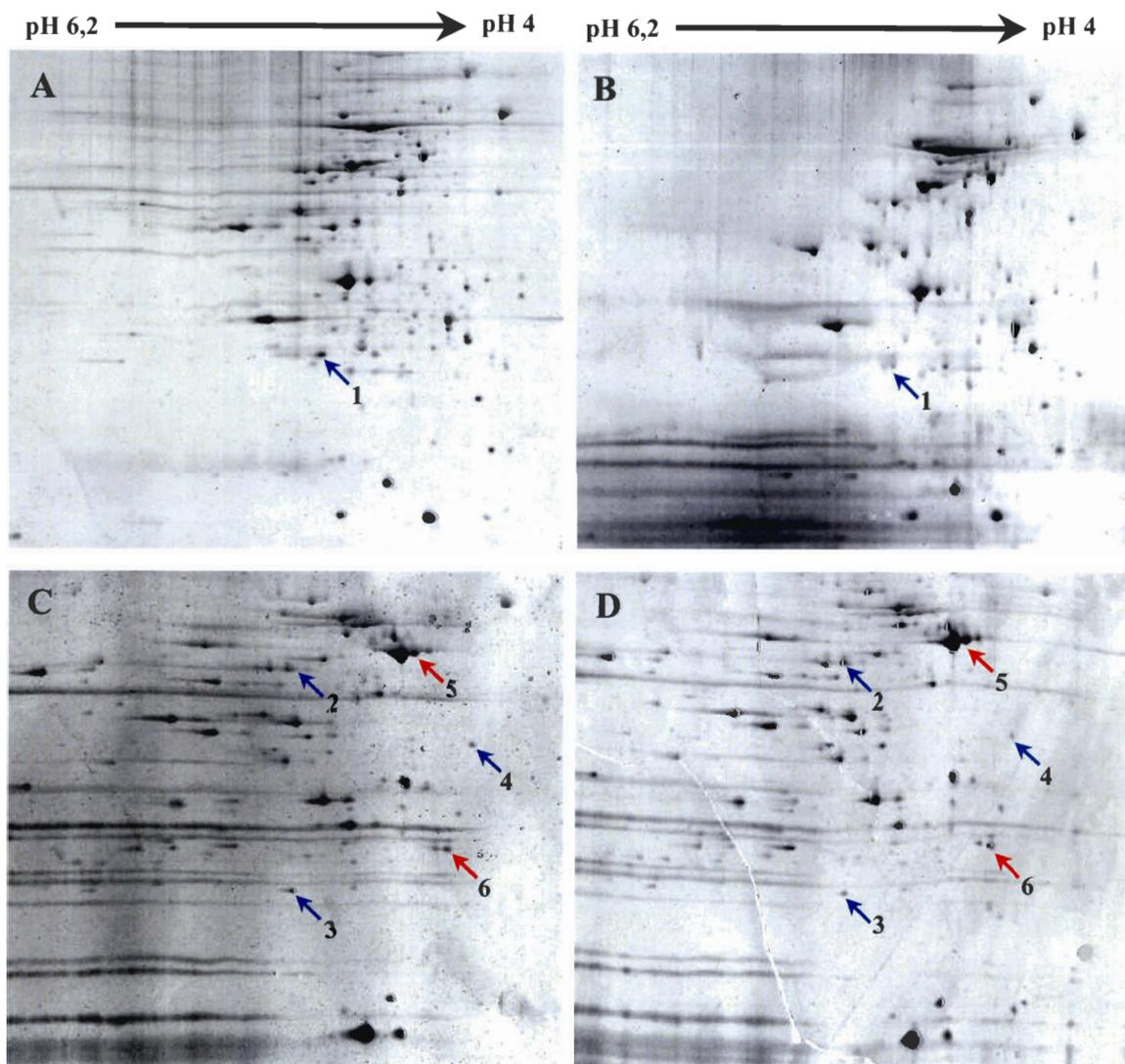


Figure 43 : Protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 en phase exponentielle de croissance. Les profils ont été obtenus suite à une focalisation isoélectrique des protéines dans un gradient de pH linéaire couvrant les pH 4 à 7 suivie d'une séparation par SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par coloration au nitrate d'argent. A et B, profils des protéines solubles provenant des souches ATCC 25975 et G71, respectivement. C et D, profils des protéines membranaires provenant des souches ATCC 25975 et G71, respectivement. Les chiffres correspondent à ceux présentés au tableau 11 ; les flèches rouges représentent des protéines surexprimées chez le mutant alors que les flèches bleues indiquent l'inverse.

Tableau 11 : Protéines exprimées de façon différente chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71 récoltées en phase exponentielle de croissance.

#	Protéine homologue ^a	Microorganisme (Swiss prot #)	Migration observée (pI / kDa)	Migration théorique (pI / kDa)	# peptides identiques	Pointage
Protéine sous-exprimée chez G71						
1	Orotate phosphorybosyltransférase	<i>Streptococcus mutans</i> (Q8DTV2)	5,0 / 24,2	5,4 / 22,8	1	40,44
2	Galactokinase	<i>Streptococcus salivarius</i> (Q8VS93)	5,1 / 45,1	5,0 / 43,4	11	652,89
3	Orotate phosphorybosyltransférase	<i>Streptococcus mutans</i> (Q8DTV2)	5,1 / 21,1	5,4 / 22,8	3	82,55
4	Pas d'identification		4,5 / 36,2			
Protéine surexprimée chez G71						
5	2-phosphoglycérate déshydratase (énolase)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Q8VVB4)	4,7 / 48,8	4,7 / 47,0	16	878,53
6	GlnQ	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Q93T27)	4,5 / 23,7	5,0 / 27,1	2	93,8

^a Les protéines ont été identifiées par LC/MS/MS. L'identification des protéines dont le pointage est supérieur à 40 mais inférieur à 48 est considérée comme probable. Un pointage supérieur à 48 indique une identité ou homologie étendue à $p < 0,05$.

Parmi les protéines sous-exprimées chez le mutant, nous retrouvons l'orotate phosphorybosyltransférase. Cette protéine a été identifiée à la fois dans les extraits solubles et les extraits membranaires. Cette enzyme joue un rôle dans le métabolisme des pyrimidines, une molécule azotée hétérocyclique dont les dérivés principaux sont les bases pyrimidiques cytosine, thymine et uracile. La seconde protéine sous-exprimée, la galactokinase, est une enzyme de la voie de Leloir qui catalyse la phosphorylation du galactose en galactose-1-phosphate.

Parmi les protéines surexprimées chez le mutant, nous avons identifié l'enzyme glycolytique émolase. Cette dernière déshydrate réversiblement le 2-phosphoglycérate afin de former du PEP. Enfin, le transporteur GlnQ a aussi été observé en plus grande quantité chez le mutant G71. Ce transporteur membranaire de la glutamine serait impliqué dans les mécanismes d'adhésion et de virulence chez les streptocoques de groupe B (344).

4.1.5.2 Analyse protéomique de *S. salivarius* récoltée en phase stationnaire de croissance

L'analyse comparative des profils protéiques a aussi été effectuée pour des cultures récoltées en phase stationnaire de croissance. Tout comme pour la section précédente, un

minimum de quatre cultures différentes ont été utilisées et leurs extraits protéiques solubles et membranaires ont été analysés (Fig. 44). Nonobstant l'enzyme I, nous avons observé que le mutant G71 contenait 16 protéines dont les quantités étaient supérieures ou inférieures aux quantités détectées chez la souche parentale par un facteur d'au moins deux. Ces protéines ont été excisées du gel et analysées par spectrométrie de masse LC/MS/MS (voir section 2.19, page 69). Uniquement huit protéines ont pu être identifiées avec certitude (Tableau 12) et ce, malgré le grand nombre de génomes de streptocoques dont la séquence est connue. Dans le cas des protéines non-identifiées, nous pouvons noter que, de façon générale, elles apparaissaient sur les gels comme des taches de faible intensité, ce qui a pu nuire à leur identification. En effet, il a été rapporté que la coloration au nitrate d'argent, bien que compatible avec l'analyse des peptides par spectrométrie LC/MS/MS, diminuait l'efficacité de digestion des protéines par la trypsine (294).

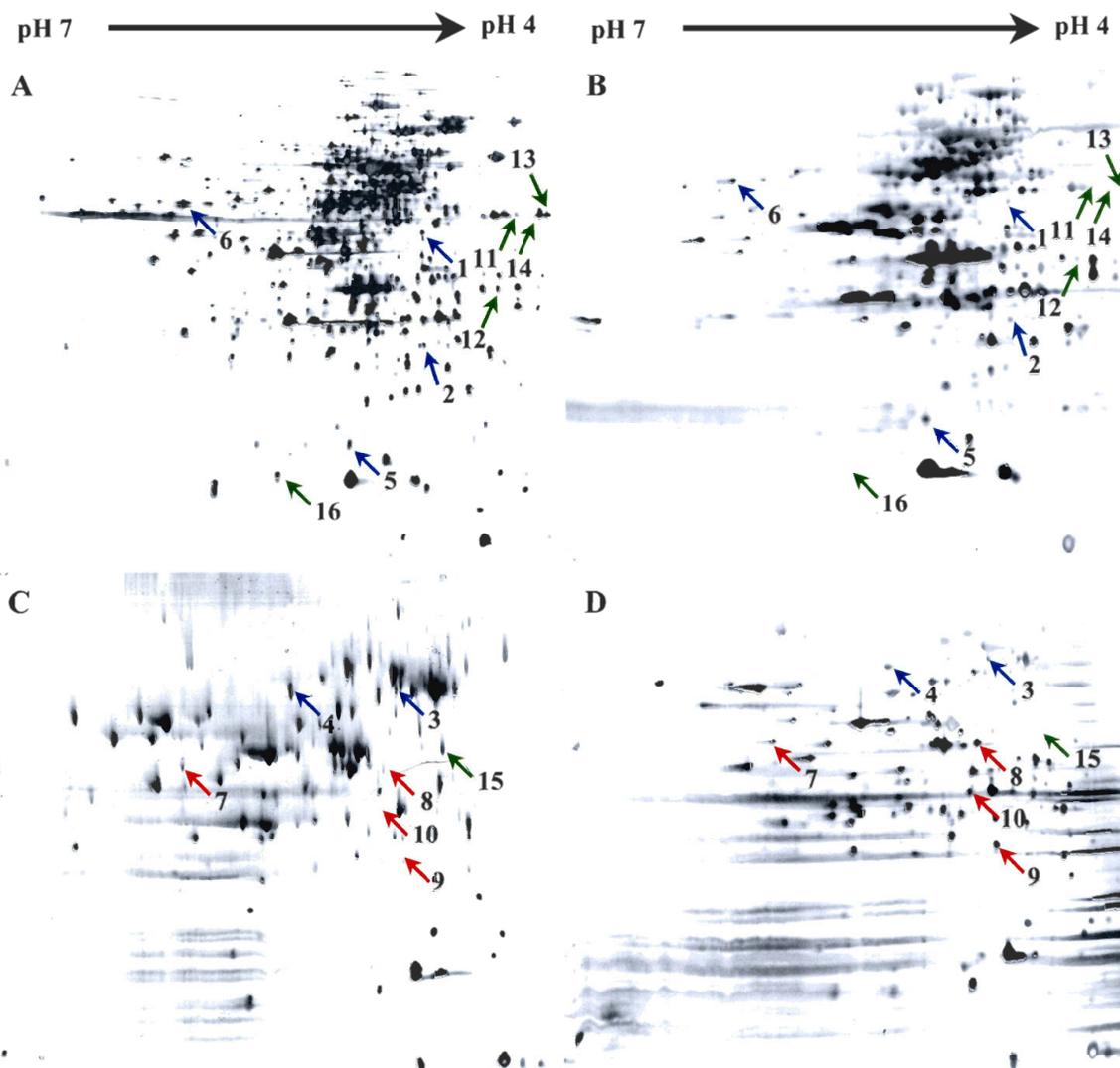


Figure 44 : Protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 en phase stationnaire de croissance obtenus par électrophorèse 2D. Les profils protéiques ont été obtenus suite à une focalisation isoélectrique des protéines dans un gradient de pH linéaire couvrant les pH 4 à 7 suivie d'une séparation par SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par coloration au nitrate d'argent. A et B, profils des protéines solubles provenant des souches ATCC 25975 et G71, respectivement. C et D, profils des protéines membranaires provenant des souches ATCC 25975 et G71, respectivement. Les chiffres correspondent à ceux présentés au tableau 12 ; les flèches rouges indiquent des protéines surexprimées chez le mutant ; les flèches bleues indiquent l'inverse ; les flèches vertes indiquent des protéines retrouvées uniquement chez la souche sauvage.

Tableau 12 : Protéines exprimées de façon différente chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71 récoltées en phase stationnaire de croissance.

#	Protéine homologue ^a	Microorganisme (Swiss prot #)	Migration observée (pI / kDa)	Migration théorique (pI / kDa)	# peptides identiques	Pointage
Protéine sous-exprimée chez G71						
1	Fructokinase	<i>Streptococcus mutans</i> (Q07211)	5,3 / 32,2	5,4 / 31,8	2	106,59
2	α -isopropylmalate isomérase	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> (Q02144)	4,7 / 25,0	5,1 / 21,9	1	41,63
3	Glucose-6-phosphate isomérase	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Q8VVB7)	4,9 / 61,7	5,0 / 49,8	4	191,58
4	Glutamate déshydrogénase (NADP(+)) putative	<i>Streptococcus mutans</i> (Q8DUL2)	5,4 / 59,7	5,4 / 48,3	19	847,69
5	Pas d'identification		5,0 / 16,4			
6	Pas d'identification		5,8 / 46,0			
Protéine surexprimée chez G71						
7	Phosphate acétyltransférase	<i>Streptococcus mutans</i> (Q8DUA0)	6,0 / 43,3	4,9 / 36,4	1	49,48
		<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (Q8EM38)	6,0 / 43,3	4,7 / 34,8	2	81,28
8	Chaîne β d'une acétoïne déshydrogénase putative	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Q99ZX7)	5,0 / 42,9	4,9 / 35,8	3	106,74
9	Protéine hypothétique conservée	<i>Streptococcus mutans</i> (Q8DVS4)	4,9 / 25,8	4,9 / 19,7	1	63,95
10	Pas d'identification		5,0 / 34,7			
Protéine présente uniquement chez ATCC 25975						
11	Pyrophosphatase inorganique Mn-dépendante putative	<i>Streptococcus gordonii</i> (P95765)	4,3 / 43,5	4,5 / 33,5	4	204,55
12	Pas d'identification		4,4 / 31,7			
13	Pas d'identification		4,1 / 43,4			
14	Pas d'identification		4,2 / 43,6			
15	Pas d'identification		4,7 / 45,4			
16	Pas d'identification		5,3 / 14,4			

^a Les protéines ont été identifiées par LC/MS/MS. L'identification des protéines dont le pointage est supérieur à 40 mais inférieur à 48 est considérée comme probable. Un pointage supérieur à 48 indique une identité ou homologie étendue à $p < 0,05$.

Parmi les protéines sous-exprimées chez le mutant, nous retrouvons deux enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres. La fructokinase catalyse la phosphorylation du fructose aux dépens de l'ATP pour former du fructose-6-phosphate qui peut alors intégrer la voie métabolique de la glycolyse. Chez *Clostridium acetobutylicum*, le gène codant pour la fructokinase est présent dans l'opéron *scrAKB* qui est lui-même précédé d'une séquence classique d'antiterminaison ribonucléique (RAT) ou encore d'une séquence *cre* (284, 349). En revanche, chez les bactéries lactiques, il y a présence de deux opérons côte à côte mais

divergent l'un de l'autre et aucune séquence *cre* ou RAT n'a été rapportée (284). La glucose-6-phosphate isomérase catalyse la conversion réversible du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. La réaction formant le fructose-6-phosphate est favorisée lors de la glycolyse alors que la réaction inverse est favorisée lors de la gluconéogenèse qui consiste en la production de glucose à partir de composés à deux ou trois carbones ou encore de certains intermédiaires du cycle de Krebs (346). L' α -isopropylmalate isomérase est impliquée dans la biosynthèse de la leucine à partir du pyruvate. Une glutamate déshydrogénase (NADP(+)) putative serait sous-exprimée chez le mutant G71. Cette enzyme catalyse la réaction réversible de la transformation du glutamate en 2-oxoglutarate. La réaction inverse menant à la formation de glutamate permet la séquestration d'ammoniac.

En phase stationnaire de croissance, on retrouve également quatre protéines surexprimées chez le mutant dont trois ont pu être identifiées. La phosphate acétyltransférase, de concert avec l'acétate kinase, forme une voie clé menant à la synthèse de l'intermédiaire métabolique acétylcoenzyme A, à partir d'acétate ou encore permet la formation d'ATP à partir d'acétylcoenzyme A excédentaire (163). La chaîne β de l'acétoïne déshydrogénase fait partie du système enzymatique de l'acétoïne déshydrogénase. Ce système, sous le contrôle de CcpA chez *B. subtilis* (407), permet la conversion réversible du diacétyl en acétoïne. Cette voie, qui participe à la régulation du ratio NAD^+/NADH , assure la synthèse d'un composé neutre qui peut servir de réserve de carbone et, advenant qu'il soit excrété de la cellule, l'acétoïne n'acidifie pas le milieu environnant (407). Chez *S. thermophilus*, une espèce phylogénétiquement rapprochée de *S. salivarius*, la voie de synthèse de la leucine et de la valine est détournée vers la synthèse d'acétoïne lorsque les cellules sont cultivées en présence de concentrations élevées en leucine et en valine (149). Finalement, une protéine hypothétique conservée a été identifiée. Aucune information supplémentaire n'est disponible sur cette protéine.

Enfin, des six protéines qui ont été retrouvées uniquement chez *S. salivarius* ATCC 25975, une seule a pu être identifiée : une pyrophosphatase inorganique Mn-dépendante putative. De façon générale, ces enzymes clivent le pyrophosphate en deux molécules de phosphate inorganique. Cette réaction exergonique libère environ 34 kilojoules et est souvent couplée

à une autre réaction moins favorable énergétiquement (193). Chez *S. salivarius* ATCC 25975, une pyrophosphatase inorganique a été purifiée jusqu'à homogénéité (179) et son substrat consiste en un complexe Mg-pyrophosphate.

4.1.6 Analyse protéomique de *S. salivarius* par électrophorèse différentielle

Afin de valider les résultats obtenus lors de l'analyse comparative des profils protéiques effectuée pour des cultures récoltées en phase stationnaire de croissance, des extraits cellulaires totaux des deux souches ont été étudiés par électrophorèse différentielle (DiGE). Brièvement, la technique consiste, dans un premier temps, à marquer les protéines des extraits cellulaires de chacune des souches étudiées avec des molécules fluorescentes de différentes couleurs. Ensuite, les extraits cellulaires sont réunis et, tout comme pour l'analyse des protéomes par électrophorèse 2D, les protéines sont séparées en fonction de leur pI et de leur masse moléculaire. Les différentes molécules fluorescentes sont excitées à leur longueur d'onde spécifique et les patrons obtenus sont superposés (Fig. 45), puis analysés. Compte tenu que les échantillons migrent en même temps sur le même gel, les protéines de même nature provenant d'extraits cellulaires différents ne peuvent migrer de façon différente. En tout, 21 protéines, dont les niveaux variaient par un facteur minimal de deux, ont été observées. Ces dernières ont été excisées du gel et 11 d'entre elles ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF. Dès 11 protéines analysées, neuf échantillons ont pu être identifiées avec certitude (Tableau 13). Les DiGE, l'analyse et l'identification des protéines par MALDI TOF/TOF ont été effectuées par Applied Biomics (Hayward, CA).

Deux protéines sous-exprimées chez le mutant G71 ont été identifiées par spectrométrie de masse. La carbamoyl-phosphate synthétase II, tout comme l'orotate phosphoribosyltransférase identifiée en phase exponentielle de croissance, est impliquée dans le métabolisme des pyrimidines, une molécule azotée hétérocyclique dont les dérivés principaux sont les bases pyrimidiques cytosine, thymine et uracile. Elle catalyse la première réaction du métabolisme des pyrimidines qui consiste en la synthèse de carbamoyl-phosphate à partir de l'acide aminé Gln. La protéase Clp est impliquée dans la réponse générale de *S. mutans* (68) au stress et participe à la virulence de *S. pneumoniae* (162).

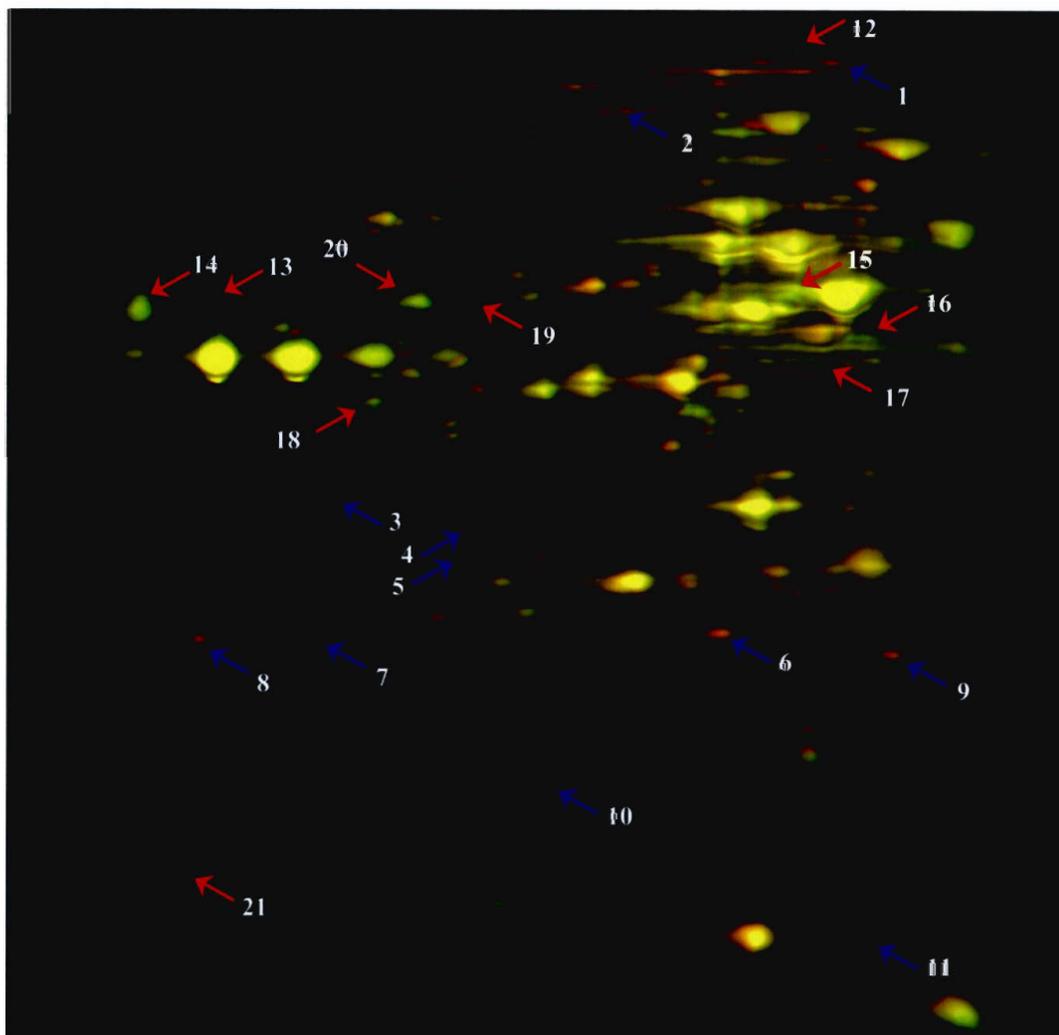


Figure 45 : Protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 en phase stationnaire de croissance obtenus par la méthode d'analyse DiGE. Les extraits cellulaires totaux ont été marqués à l'aide de molécules fluorescentes et le profil protéique des deux souches a été obtenu à la suite d'une focalisation isoélectrique des protéines dans un gradient de pH linéaire couvrant les pH 4 à 7 suivie d'une séparation par SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par excitation des fluorochromes. Les protéines de l'extrait cellulaire de *S. salivarius* ATCC 25975 ont été marquées à l'aide d'un fluorochrome rouge alors que les protéines de l'extrait cellulaire de *S. salivarius* G71 ont été marquées à l'aide d'un fluorochrome vert. Les chiffres correspondent à ceux présentés au tableau 13, les flèches rouges indiquent des protéines surexprimées chez le mutant alors que les flèches bleues indiquent l'inverse.

Tableau 13 : Protéines exprimées de façon différente chez *S. salivarius* ATCC 25975 et G71 récoltées en phase stationnaire de croissance après analyse par DiGE

#	Protéine homologue ^a	Microorganisme (GenPept #)	Migration observée (pI / kDa)	Migration théorique (pI / kDa)	Test-T	Pointage (%)
Protéine sous-exprimée chez G71						
1	Carbamoyl-phosphate synthétase, sous-unité large	<i>Streptococcus thermophilus</i> (gi : 55822498)	4,8 / 117,1	4,7 / 116,4	0,023	100
2	Protéase Clp ATP-dépendante	<i>Streptococcus thermophilus</i> (gi : 55820681)	5,3 / 105,7	5,4 / 83,7	0,01	100
3	Protéine non analysée		5,8 / 34,3		0,016	
4	Protéine non analysée		5,5 / 31,5		0,0037	
5	Protéine non analysée		5,5 / 29,4		0,0027	
6	Protéine non analysée		5,0 / 23,8		0,03	
7	Protéine non analysée		5,9 / 23,6		0,0055	
8	Protéine non analysée		6,1 / 23,6		0,0084	
9	Protéine non analysée		4,6 / 22,0		0,014	
10	Protéine non analysée		5,3 / 13,1		0,00042	
11	Protéine non analysée		4,7 / 6,1		0,0045	
Protéine surexprimée chez G71						
12	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gi : 13621347)	4,9 / 123,9	4,7 / 136,7	0,013	100
13	Transporteur de sucre ABC, protéine fixatrice de l'ATP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (gi : 15901422)	6,1 / 54,6	5,8 / 41,8	0,016	100
14	Transporteur ABC, <i>multiple sugar-binding</i> , protéine fixatrice de l'ATP	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gi : 13622991)	6,2 / 54,6	5,7 / 42,0	0,013	100
15	Phosphoglycérate kinase	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gi : 19746807)	4,9 / 55,1	4,9 / 42,1	0,039	100
16	Dipeptidase	<i>Streptococcus thermophilus</i> (gi : 55822599)	4,7 / 50,5	4,7 / 40,2	0,0067	99,998
17	L-Lactate déshydrogénase	<i>Streptococcus mutans</i> (gi : 97995)	4,8 / 47,0	5,1 / 35,3	0,0054	100
18	Phosphate acétyltransférase	<i>Streptococcus thermophilus</i> (gi : 55823365)	5,7 / 44,1	5,1 / 35,4	0,026	99,999
19	Protéine hypothétique BCE 3971	<i>Bacillus cereus</i> (gi : 42783019)	5,5 / 56,4	8,6 / 45,2	0,019	0
20	Protéine ATPase	<i>Streptococcus pyogenes</i> (gi : 19746905)	5,6 / 56,4	7,8 / 29,4	0,049	0
21	Protéine non analysée		6,2 / 8,1		0,013	

^a Les protéines ont été identifiées par MALDI TOF/TOF. Le test-T de Student est considéré comme significatif lorsque $p < 0,05$. Le pointage est exprimé en pourcentage et représente le degré de confiance obtenue lors de l'identification des protéines.

On retrouve également dix protéines surexprimées chez le mutant. Neuf d'entre elles ont été analysé par spectrométrie de masse et sept ont été identifiées. La phosphoribosylformylglycinamide synthase participe à la voie de synthèse des purines aux dépens de l'acide aminé Gln. Les transporteurs ABC assurent le transport de molécules aux dépens de l'ATP. Les deux protéines identifiées sont toutes deux la sous-unité du transporteur qui fixe l'ATP. Il se pourrait que les deux protéines soient la même. La dipeptidase serait une Xaa-Pro aminopeptidase. La phosphoglycérate kinase catalyse la synthèse de phosphoglycérate et d'ATP aux dépens du bisphosphoglycérate et de l'ADP dans la voie de la glycolyse. La lactate déshydrogénase catalyse la réaction réversible de la biosynthèse de lactate à partir d'une molécule de pyruvate. La phosphate acetyltransférase a de nouveau été identifiée. Elle avait été observée lors de l'analyse des protéomes par électrophorèse 2D de *S. salivarius* recueillie en phase stationnaire de croissance.

4.2 Résumé des principaux résultats du chapitre 4

L'étude des gènes régulés par HPr(His~P) chez *S. salivarius* a été effectuée chez des cellules cultivées en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Afin d'identifier ces gènes, nous avons procédé à des analyses comparatives par électrophorèse 2D et par DiGe des profils protéiques de la souche parentale et de la souche mutante G71. La caractérisation de ce mutant EI-négatif a permis de déterminer que le mutant était incapable de croître en présence d'un sucre PTS et que le maltose était transporté *via* le PTS chez *S. salivarius*. De même, il a été observé que la cellule était incapable de phosphoryler HPr sur son résidu His₁₅, que la quantité totale de HPr augmente au cours de la croissance mais qu'elle produisait environ 1,3 fois moins de HPr que la souche sauvage tout au long de sa croissance. Les analyses des transcrits de l'opéron *pts* n'ont pas permis d'expliquer clairement les variations mesurées entre les concentrations de HPr chez les cellules récoltées en phase exponentielle ou stationnaire de croissance ainsi que la variation de 1,3 fois calculée entre la souche sauvage et le mutant. Enfin, les mesures effectuées par immunoelectrophorèse croisée ont montré qu'en phase exponentielle de croissance, la concentration en HPr(Ser-P) était similaire chez les deux souches.

En phase exponentielle de croissance, les analyses des profils protéiques ont été faites par électrophorèse 2D : cinq protéines différentes étaient surexprimées ou sous-exprimées par un facteur deux chez le mutant. En phase stationnaire de croissance, les analyses des profils protéiques ont été effectuées par électrophorèse 2D et par DiGe : 38 protéines différentes étaient surexprimées ou sous-exprimées par un facteur deux chez le mutant.

Chapitre 5

Discussion

5.1 Au sujet de HPr(Ser-P)(His~P)

5.1.1 Bref rappel

En 1984, Deutscher *et al.* (72) démontrèrent pour la première fois que la phosphorylation de HPr sur le résidu Ser₄₆ par la HprK/P de *E. faecalis* inhibe de façon importante la phosphorylation de HPr sur le résidu His₁₅ par EI. En effet, le taux de phosphorylation de HPr par EI, dans ces conditions, est réduit d'environ 5 000 fois. Des résultats similaires ont par la suite été obtenus avec les protéines HPr et EI provenant de d'autres bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C incluant *S. salivarius* et *B. subtilis* (48, 293). Bien que la phosphorylation du résidu Ser₄₆ ne modifie pas significativement la structure de HPr (24, 253), l'absence de phosphorylation de HPr(Ser-P) par EI proviendrait d'une perturbation au niveau des interactions hydrophobiques entre l'enzyme et son substrat causée par des répulsions électrostatiques entre le résidu phosphosérine, chargé négativement, et un résidu glutamate présent sur l'enzyme I (24, 143). Ainsi, il est généralement admis que chez les

bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, la phosphorylation de HPr sur le résidu Ser₄₆ sert à réduire le transport des sucres par le PTS (72, 310).

Alors que plusieurs études ont rapporté l'absence ou la présence en faible quantité de HPr(Ser-P)(His~P) chez différentes bactéries à Gram positif ayant un faible contenu en G+C comme *B. subtilis* (247), *E. faecalis* (196), *S. bovis* (20) et *L. lactis* (245), une étude antérieure de Vadeboncoeur *et al.* (369) a montré que des cellules de *S. salivarius* et *S. mutans*, récoltées en phase exponentielle de croissance, contenaient d'importante quantité de la forme HPr doublement phosphorylée, suggérant que cette forme de HPr serait présente en forte concentration chez certaines espèces du genre *Streptococcus*. Pour expliquer la divergence entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux obtenus *in vivo*, une étude récente effectuée avec les protéines HPr et EI de *S. salivarius* et *B. subtilis* propose un modèle qui permettrait d'expliquer le mécanisme de phosphorylation de HPr(Ser-P) par EI aux dépens du PEP. Ce modèle est basé sur l'observation que le taux de phosphorylation de HPr par EI diminue significativement à pH acide alors que la phosphorylation de HPr(Ser-P) par EI est largement stimulée (48). Les auteurs proposent que la stimulation de la phosphorylation de HPr(Ser-P) par EI à pH acide résulte en partie de la neutralisation partielle de la charge négative du résidu phospho-Ser₄₆ de HPr(Ser-P) et/ou du résidu glutamyl de EI (48). La neutralisation de ces charges négatives permettrait d'abaisser la répulsion électrostatique entre ces résidus et, par le fait même, de stabiliser le complexe EI/HPr(Ser-P) et ainsi de permettre la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) (48). Leurs résultats suggèrent donc que la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) serait favorisée chez les bactéries acidogènes incapables de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité, comme c'est le cas chez les streptocoques et les lactocoques (176, 256). À l'opposé, les espèces qui maintiennent leur pH intracellulaire près de la neutralité, comme c'est le cas de *B. subtilis* et *E. faecalis*, seraient incapables de produire des quantités substantielles de cette forme de HPr (42, 176).

Cependant, les travaux de Gunnewick *et al.* (127) ont montré que les concentrations de HPr(Ser-P)(His~P) chez des cellules de *S. thermophilus* ST11 récoltées en phase exponentielle de croissance demeurent marginales suggérant que la présence de cette forme de HPr ne serait pas une caractéristique commune à tous les streptocoques. De même,

rappelons que des résultats similaires ont été obtenus chez *S. bovis* et *L. lactis*, deux espèces bactériennes incapables, en cours de croissance, de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité. Les travaux de Cochu *et al.* (56) vinrent accroître la controverse sur la présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les streptocoques. En effet, ces auteurs rapportent la présence de niveaux élevés de HPr(Ser-P)(His~P) chez deux souches de *S. thermophilus*, soit les souches ATCC 19258 et SMQ-301. Il existait donc, au début de mes travaux de doctorat, une confusion quant à la présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C.

5.1.2 HPr(Ser-P)(His~P) : un intermédiaire ignoré

B. subtilis est un modèle bactérien de référence chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C. Cependant, malgré l'observation de concentration importante de HPr(Ser-P)(His~P) chez quelques streptocoques, la principale revue scientifique portant sur le PTS, parue en décembre 2006, n'en fait à peine mention (70). Il semble probable que l'absence de HPr(Ser-P)(His~P) chez *B. subtilis* et l'observation *in vitro* que la phosphorylation de HPr sur un résidu inhibe la phosphorylation sur le second résidu soit, du moins en partie, responsable du peu d'intérêt de cet intermédiaire pour la communauté scientifique. En effet, à l'exception des travaux démontrant la capacité de HPr(Ser-P)(His~P) à phosphoryler les transporteurs LacS de *S. salivarius* et *S. thermophilus* (56, 202) et son incapacité à se lier à CcpA (74), aucune étude, à ce jour, ne s'est attardée sur le rôle physiologique de HPr(Ser-P)(His~P). Ainsi, il nous semblait important de vérifier si la forme doublement phosphorylée de HPr partage certaines fonctions associées à HPr(Ser-P) ou à HPr(His~P).

5.1.3 Présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C

5.1.3.1 Détermination des différentes formes de HPr chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer s'il y avait présence en quantité importante de HPr doublement phosphorylée chez différentes bactéries à Gram positif à

faible contenu en G+C de la classe des *Bacilli*. Vu leur importance pour l'industrie et le caractère pathogène de certaines espèces, nous avons d'abord centré notre étude sur une sélection de bactéries lactiques dont des streptocoques, des lactocoques et des lactobacilles. De plus, les niveaux de HPr ont été déterminés chez *E. faecalis* et *B. subtilis*, des bactéries modèles de leur genre respectif. Enfin, pour la première fois à notre connaissance, la mesure des différentes formes de HPr a été effectuée chez *S. aureus*, une espèce pathogène. Bien que les analyses aient été effectuées à l'aide des deux techniques retrouvées dans la littérature soit par immunoélectrophorèse croisée et par immunobuvardage de type Western, cette dernière sera traitée ultérieurement (voir section 5.1.3.2.2, page 131).

Nos résultats ont montré que les concentrations de HPr(His~P) sont généralement faibles alors que celles de HPr(Ser-P)(His~P) sont plutôt élevées chez les streptocoques et les lactocoques lorsque les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance. En accord avec la littérature, la forme doublement phosphorylée de HPr n'a pas été détectée à des concentrations significatives chez *E. faecalis* et *B. subtilis* (196, 247). Enfin, nous avons observé que les proportions des différentes formes de HPr chez *S. aureus* correspondent aux profils observés chez *B. subtilis* et *E. faecalis*, soit une absence complète de HPr(Ser-P)(His~P), de faible proportion de HPr et de HPr(His~P) et une très grande proportion de HPr(Ser-P) ($\geq 85\%$).

Il est intéressant de noter que HPr(Ser-P)(His~P) est retrouvée en concentration élevée chez les lactocoques et les streptocoques, deux genres bactériens rapprochés phylogénétiquement (336). La forme doublement phosphorylée de HPr est absente chez *B. subtilis*, *E. faecalis* et *S. aureus*, un groupe phylogénétique distinct de celui auquel appartiennent les lactocoques et les streptocoques (Fig. 46). Ainsi, il semblerait que la capacité des streptocoques et des lactocoques à synthétiser efficacement HPr(Ser-P)(His~P) se soit développée après l'apparition de la branche séparant ces deux groupes. Les travaux de Casabon *et al.* (48) ont montré que la vitesse de synthèse de HPr(His~P) décroît à pH acide alors que la phosphorylation de HPr(Ser-P) par EI augmente. Il est intéressant de noter que le groupe formé par les streptocoques et les lactocoques contrairement à celui de *Bacillus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*, est constitué d'espèces incapables de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité en réponse à une baisse du pH extracellulaire

(176, 256, 283, 295, 296). Nos résultats soutiennent donc l'hypothèse voulant que l'accumulation de HPr(Ser-P)(His~P) se produit chez des cellules incapables de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité lorsque le pH du milieu baisse. De plus, la présence de HPr(Ser-P)(His~P) chez *M. pneumoniae* (131), une espèce bactérienne phylogénétiquement distante des *Streptococcaceae* (Fig. 46), lorsque cette dernière croît en présence de glycérol suggère que cette dernière pourrait être soumise à des conditions physiologiques favorisant également la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P). En effet, tout comme les streptocoques et les lactocoques, les bactéries du genre *Mycoplasma* seraient incapables de résister à l'acidification du milieu extracellulaire (299).

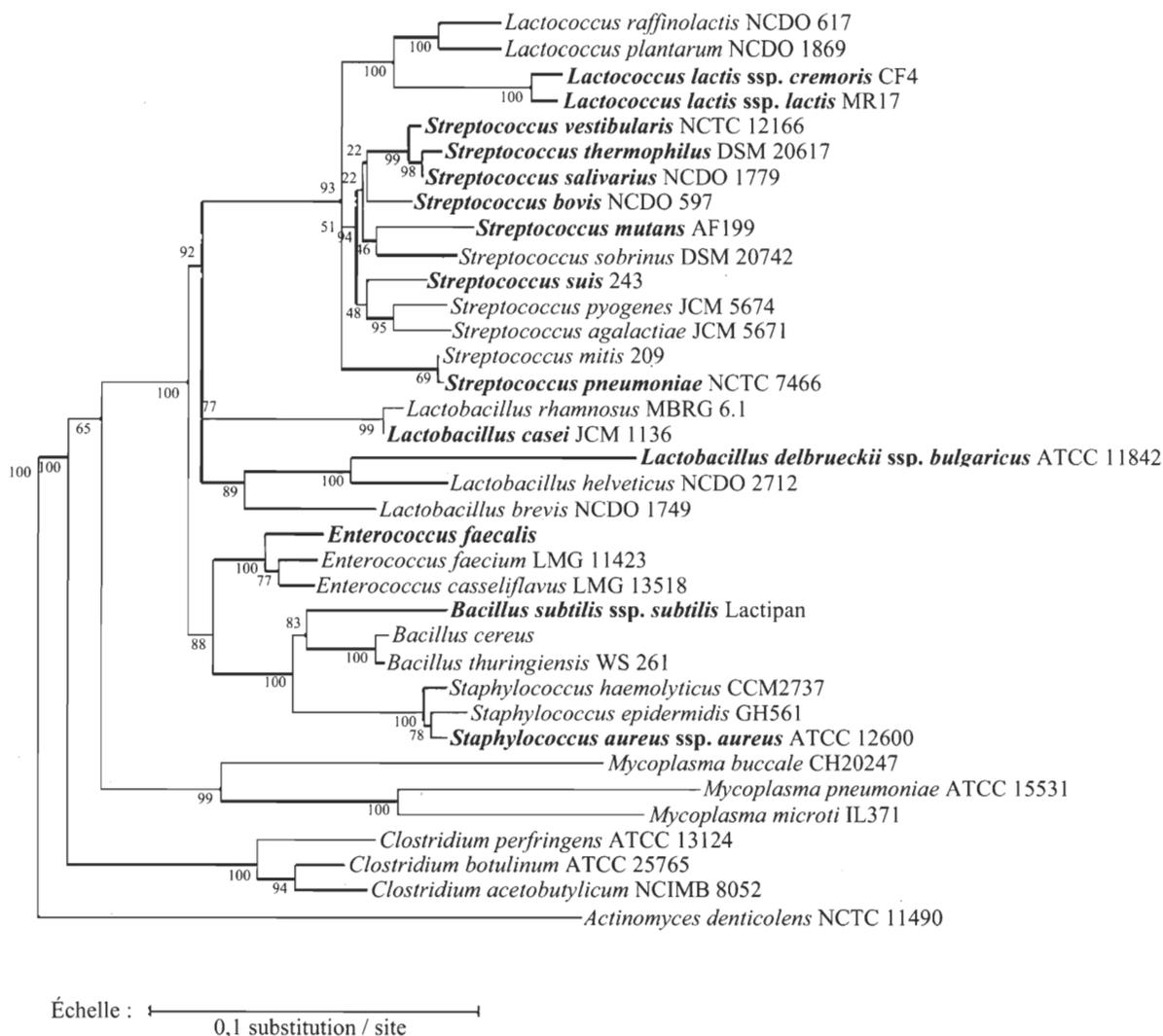


Figure 46 : Arbre consensus calculé par l’algorithme Weighbor (47) basé sur les séquences de l’ARN ribosomal 16S de bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C (58). La séquence de *Actinomyces denticolens*, une bactérie à Gram positif à haut contenu en G+C, a été employée comme groupe externe afin d’enraciner l’arbre. Au total, 100 arbres ont été générés et les valeurs de *bootstrap*, représentant le pourcentage de fois où un noeud donné était observé, sont indiquées à chacun de ces noeuds. Le dosage des différentes formes de HPr a été effectué chez toutes les espèces bactériennes en caractère gras.

5.1.3.2 Aux sujets des méthodes et des conditions de détermination des différentes formes de HPr

Dans le but d’éclaircir certaines différences que nous avons observées entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature, nous avons procédé à divers essais afin de déterminer les raisons de ces divergences. Dans les études rapportant les proportions des différentes

formes de HPr chez différentes bactéries, les proportions des formes de HPr ont toujours été estimées par immunobuvardage de type Western contrairement aux analyses effectuées par l'équipe de Vadeboncoeur, qui emploie la technique d'immunoélectrophorèse croisée (56, 369). De plus, alors que l'addition d'un ionophore suivi par l'acidification du milieu intracellulaire fait partie intégrante de la technique développée par Vadeboncoeur *et al.* (369) afin d'inactiver les enzymes participant à la phosphorylation et à la déphosphorylation des différentes formes de HPr, il arrive que cette étape, importante au maintien des différentes formes de HPr, soit ignorée ou qu'il n'y ait pas mention de l'addition d'un ionophore (196, 245). Ainsi, il se pourrait que l'utilisation de techniques différentes ait un impact important sur la détermination des formes de HPr. Pour preuve, les deux études effectuées chez *S. thermophilus* suggèrent, du moins en partie, une variation des niveaux de HPr en fonction de la souche utilisée (56) mais elle n'explore pas la possibilité qu'un biais sur les résultats soit imposé par la technique employée. De la même façon, l'absence de l'acidification intracellulaire pourrait aussi avoir un impact important sur la détermination des différentes formes de HPr. En effet, il a été démontré qu'à pH acide, les enzymes EI et HprK/P de *S. salivarius*, *S. pyogenes* et *E. faecalis* sont inactivées (73, 289, 373). De même, les niveaux de FBP et de PEP restent relativement stables chez *S. salivarius* (369) suggérant que l'activité glycolytique est inhibée rapidement et efficacement à pH acide. Cette étape serait donc importante pour l'obtention des niveaux intracellulaires des différentes formes de HPr présentant un reflet le plus exact possible de la situation *in vivo*.

5.1.3.2.1 Impact de l'acidification intracellulaire sur la détermination des différentes formes de HPr

Pour que les proportions des différentes formes de HPr déterminées *in vitro* soit le reflet de la situation *in vivo*, la détermination des niveaux de HPr chez les espèces bactériennes testées doit se faire sous des conditions assurant la stabilité des différentes formes de HPr. Chez *S. salivarius*, il a été démontré que l'acidification rapide du milieu intracellulaire, obtenue par l'addition d'un ionophore au milieu de culture suivi d'une acidification rapide du milieu (369), inactive les deux enzymes principales participant à la phosphorylation et à la déphosphorylation de HPr : EI et HprK/P. Afin de confirmer l'importance de cette

acidification intracellulaire dans le maintien des différentes formes de HPr, les proportions des différentes formes de HPr ont été mesurées chez *S. salivarius* sans acidification du milieu. Le résultat est frappant. On détecte sous ces conditions des quantités moins importantes de HPr(Ser-P) (<1%) et de HPr doublement phosphorylée (20% du HPr total). La variation importante entre les résultats obtenus de cellules de *S. salivarius* avec ou sans acidification intracellulaire montre que, en absence d'une telle acidification, il peut y avoir une dégradation importante de la forme HPr(Ser-P) qui pourrait être due à une activité phosphorylase de la HprK/P. En effet, il a été démontré que l'activité kinase de la HprK/P peut être activée en présence de FBP (76, 164), d'ATP (186) et de PP_i (240) et que ces constituants sont en concentrations élevées en présence d'un sucre rapidement métabolisable comme le glucose (274). Ainsi, l'arrêt rapide de la croissance par l'addition au milieu d'un agent bactériostatique comme la gramicidine D sans acidification du milieu aurait comme effet d'abaisser les concentrations de ces constituants et, par le fait même, de favoriser l'activité phosphorylase de la HprK/P, elle même activée par le P_i dont la concentration en phase exponentielle peut atteindre plus de 50 mM (83). Ces résultats établissent l'importance de l'acidification intracellulaire des cellules dans le but de maintenir la stabilité des différentes formes de HPr.

Ces résultats expliquent d'ailleurs le retrait des lactobacilles de cette étude. Ces derniers étant résistants aux ionophores testés, il était impossible de procéder à l'acidification du milieu intracellulaire. D'ailleurs, lors des déterminations des différentes formes de HPr chez *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, une souche dont la croissance n'est pas inhibée par la gramicidine D, nous avons obtenu des résultats similaires à ceux observés chez *S. salivarius* lorsque l'expérience était réalisée sans l'étape d'acidification du milieu suite au traitement avec l'ionophore, soit une très grande proportion de HPr libre et de HPr(His~P). Il en résulte que, dans l'état actuel des choses, aucune conclusion ne peut être tirée des résultats obtenus chez les lactobacilles.

5.1.3.2.2 Analyse Western versus immunoélectrophorèse croisée

Les résultats que nous avons obtenus avec *S. bovis* et *L. lactis* diffèrent de ceux rapportés dans la littérature (21, 245). En effet, alors que des niveaux élevés de HPr libre et des

niveaux faibles de HPr(Ser-P)(His~P) ont été rapportés après croissance en présence de glucose chez ces deux espèces, nos résultats indiquent le contraire : de bas niveau de HPr libre et des concentrations importantes de HPr doublement phosphorylée (>50% du HPr total) (Tableau 4). Cette contradiction peut être partiellement expliquée par le fait que les résultats déjà publiés proviennent de déterminations faites par immunobuvardage de type Western. En effet, l'examen des résultats obtenus par immunoélectrophorèse croisée et immunobuvardage de type Western (voir Tableau 4 et 6, pages 78 et 81, respectivement) laisse croire que la technique d'immunobuvardage n'est pas appropriée pour déterminer de façon quantitative les proportions *in vivo* des différentes formes de HPr. Par exemple, alors que les proportions relatives de la forme doublement phosphorylée chez les streptocoques varient entre 30% et 75% du HPr total lorsque la mesure est faite par immunoélectrophorèse croisée, ces proportions chutent entre 10% et 30% lorsque les mesures sont faites par immunobuvardage de type Western. La raison pour ces divergences demeure inconnue. Cependant, l'instabilité du lien phosphoramidate à haute température (14, 23, 391) pourrait les expliquer en partie. En effet, une quantité appréciable de chaleur est générée lors de la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et, sachant qu'une augmentation de 10°C peut jusqu'à doubler la vitesse de phosphohydrolyse du lien His~P chez *E. coli* (391), ceci pourrait expliquer les concentrations élevées de HPr libre généralement détectées lorsque les mesures ont été faites par immunobuvardage de type Western alors que peu ou pas de HPr libre était détectée par immunoélectrophorèse croisée. En outre, il est reconnu que les membranes de nitrocellulose, employées lors des immunobuvardages de type Western, ne sont pas en mesure de fixer aussi efficacement les protéines de faible poids moléculaire (367). Ainsi, il est envisageable que le transfert de HPr, une protéine de 8 à 10 kDa, ne soit pas complet. Finalement, l'importance de l'acidification intracellulaire ayant été démontrée quant à la stabilité et au maintien des différentes formes de HPr chez les cellules (voir section 5.1.3.2.1, page 130), il est possible que certaines études, l'ayant omise, sous-estime les proportions de HPr(Ser-P)(His~P).

5.1.3.2.3 Effet du temps utilisé pour la préparation des extraits cellulaires sur les quantités des différentes formes de HPr mesurées

Lors des immunoelectrophorèses croisées, les extraits cellulaires des différentes espèces bactériennes étudiées étaient obtenus suite à une centrifugation de 16 heures à $200\,000 \times g$. Cette étape permet l'obtention d'extraits exempts de débris cellulaires qui pourraient interférer avec la migration des échantillons et la lecture des résultats. Contrairement à ce que nous avons observé chez la plupart des streptocoques et des lactocoques, *S. bovis* et *L. lactis* ssp. *cremoris* ATCC 19257 présentaient des niveaux importants de HPr(His~P) alors que les deux souches de *S. suis* présentaient des niveaux élevés en HPr libre et, dans le cas de *S. suis* ATCC 43765, une faible proportion de HPr(Ser-P)(His~P). Sachant qu'une présence plus importante de HPr(Ser-P) et/ou de HPr libre pourrait être dû à une déphosphorylation au niveau du résidu His₁₅, les différences observées pouvaient être le résultat d'une dégradation des différentes formes de HPr au cours de la préparation des extraits cellulaires. Dans le but de vérifier s'il y avait, chez ces espèces, une dégradation des formes de HPr qui se produisait à un rythme plus rapide que chez les autres streptocoques et lactocoques, expliquant du coup la plus grande proportion de HPr libre et l'absence de HPr(Ser-P)(His~P) chez *S. suis*, les mesures des différentes formes de HPr ont été reprises chez ces bactéries en réduisant à 90 min, au lieu de 16 h, le temps d'ultracentrifugation nécessaire à l'obtention d'un extrait cellulaire exempt de fragments membranaires. Compte tenu de la concentration importante de HPr(Ser-P) détectée chez les souches de *B. subtilis* et de *E. faecalis*, qui aurait pu résulter d'une dégradation de HPr(Ser-P)(His~P), ces bactéries ont été incluses dans cette étude. Les résultats obtenus (Tableau 5) viennent supporter l'hypothèse selon laquelle il pourrait y avoir dégradation des différentes formes de HPr chez certaines espèces bactériennes durant la préparation de l'extrait cellulaire. En effet, chez l'ensemble des streptocoques et lactocoques, nous observons une augmentation plus ou moins importante des niveaux de HPr(Ser-P)(His~P) lorsque le temps de l'ultracentrifugation est limité à 90 min. Par exemple, chez *S. suis* ATCC 43765, la proportion de HPr doublement phosphorylée s'est accrue par plus de dix fois passant de 4% à plus de 50% du HPr total. De plus, chez les espèces qui présentaient des niveaux importants de HPr libre, nous observons une diminution de cette forme au profit d'une augmentation importante des niveaux de HPr(His~P). Toutefois, les

proportions relatives des différentes formes de HPr chez *B. subtilis* et *E. faecalis* sont demeurées inchangées, ce qui consolide l'hypothèse voulant que ces espèces bactériennes ne produisent pas de HPr(Ser-P)(His~P) *in vivo*.

Dans l'ensemble, ces résultats sont cohérents avec une phosphohydrolyse du lien phosphoramidate au cours du temps. En effet, l'instabilité du lien phosphoramidate His~P est connue (23) et la vitesse de la phosphohydrolyse de ce lien chez les protéines HPr de plusieurs espèces est connue. Les taux de phosphohydrolyse répertoriés pour HPr(His~P) varient entre 0,06 min⁻¹ et 0,18 min⁻¹ à 37°C et ont été rapportés, entre autres, chez *E. faecalis* (393), *B. subtilis* (15), *E. coli* (13, 14, 391) et *S. salivarius* (48). La diminution du délai entre la préparation de l'extrait et la détermination des différentes formes de HPr permettrait ainsi de réduire, en partie, la période au cours de laquelle la phosphohydrolyse du lien phosphoramidate de HPr(His~P) et de HPr(Ser-P)(His~P) peut avoir lieu.

5.1.3.2.4 Inactivation des enzymes EI et HPrK/P à pH acide

La présence importante de HPr(Ser-P) et l'absence de HPr(Ser-P)(His~P) chez les souches de *B. subtilis*, *E. faecalis* et *S. aureus* soulèvent la question à savoir si ces résultats ne seraient pas le reflet du maintien de l'activité des enzymes responsables de la phosphorylation et déphosphorylation de HPr et ce, malgré l'acidification du milieu intracellulaire. Tel que démontré précédemment, la technique développée par Vadeboncoeur *et al.* (369) repose sur le principe que l'acidification rapide du milieu intracellulaire inactive les enzymes pouvant avoir un impact sur les formes de HPr. Des résultats présentés précédemment supportent d'ailleurs cette hypothèse puisque l'absence d'acidification conduit à des mesures des différentes formes de HPr dans des proportions différentes. L'inactivation des enzymes EI et HPrK/P à pH 4,5 a été démontrée chez *S. mutans* (369). De plus, ces observations sont en accord avec les informations rapportées pour EI de *S. salivarius* (373) et de *B. subtilis* (48) ainsi que pour la HPrK/P de *S. pyogenes* (289) et de *E. faecalis* (73). Dans le but de confirmer que les résultats observés chez *B. subtilis*, une souche présentant un profil de HPr différent des streptocoques et lactocoques, n'étaient pas le fruit d'une activité résiduelle de sa HPrK/P à pH acide, les activités kinase et phosphorylase de cette enzyme ont été déterminées à pH 4,5 et à pH 7,0. Cette analyse a

permis de démontrer que cette enzyme était inactivée efficacement à pH acide. Ainsi, ces résultats, de concert avec ceux publiés, suggèrent que, dans l'ensemble, les enzymes EI et HprK/P des *Bacilli* sont inactivées à pH acide. De ce fait, ils confirment que les profils des différentes formes de HPr observés chez *B. subtilis* sont le reflet des proportions retrouvées chez ces souches lorsque ces dernières sont en phase exponentielle de croissance en présence d'un sucre rapidement métabolisable.

5.1.4 Rôle de HPr(Ser-P)(His~P)

La présence de HPr(Ser-P)(His~P) à des concentrations élevées chez les streptocoques et les lactocoques soulèvent la question du rôle physiologique de cette forme de HPr chez ces bactéries et, plus spécifiquement, si la forme doublement phosphorylée de HPr est en mesure d'accomplir les fonctions associées à HPr(His~P) et à HPr(Ser-P). Ces fonctions sont le transport de sucres, la régulation de l'activité d'enzymes et de transporteurs et le contrôle de l'expression génétique. Alors que HPr(His~P) est impliquée dans ces trois fonctions, HPr(Ser-P) est impliquée principalement dans l'expression des gènes et dans le contrôle de l'activité de transporteur de sucres. Des études antérieures ont montré que HPr(Ser-P)(His~P) peut transférer le groupement phosphorylé présent sur son résidu His₁₅ au domaine IIA de LacS, un transporteur du lactose, un sucre non-PTS, chez *S. salivarius* et *S. thermophilus* (56, 202). Il paraissait donc important de vérifier si HPr(Ser-P)(His~P) était en mesure de participer au transport de sucre PTS et à la régulation de l'activité enzymatique par transfert de groupement phosphorylé. En revanche, chez *B. subtilis*, HPr(Ser-P)(His~P) ne peut se lier à CcpA (74) et cette forme de HPr est pratiquement incapable de phosphoryler *in vitro* le régulateur transcriptionnel PRD LicT (207). Sachant que les structures de HPr ont été résolues par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire et par cristallographie pour *E. coli* (378, 379), *E. faecalis* (24, 167, 232), *B. subtilis* (143, 170), *S. carnosus* (173, 244) et *S. aureus* (233) et que dans l'ensemble, la structure tertiaire de HPr est bien conservée chez ces bactéries (150, 166), il semble peu probable que la forme doublement phosphorylée de HPr régule la transcription de gène. Cette question sera néanmoins discutée plus longuement à la section 5.2.3.1.

5.1.4.1 Transport

Alors que des résultats antérieurs (56, 202) aient montré que HPr(Ser-P)(His~P) est en mesure d'interagir avec des protéines contenant des domaines IIA, ils ne constituent pas en soit une preuve directe que cette forme de HPr puisse transférer de façon efficace son groupement phosphoryle aux domaines IIA des complexes EII impliqués dans le transport des sucres *via* le PTS d'autant plus que les similarités de séquence en acides aminés entre le domaine IIA de LacS et les domaines IIA des EII ne sont pas importantes. En effet, malgré qu'un certain nombre de résidus soit conservés en amont et en aval du résidu His des domaines IIA recevant le groupement phosphoryle de HPr (Fig. 47A), les séquences entourant ce résidu His présentent des différences marquées. Ces différences sont encore plus évidentes lorsque la séquence en acides aminés du domaine IIA de LacS est comparée dans sa totalité à celle du domaine IIA de IIAB_L^{Man} (Fig. 47B), une protéine du PTS impliquée dans le transport et la phosphorylation du glucose, du mannose et du fructose (41, 368). Cependant, bien que ces protéines présentent des séquences en acides aminés très différentes, rien n'indiquent qu'elles ne pouvaient être phosphorylées par HPr(Ser-P)(His~P). En effet, il est reconnu que HPr est en mesure de phosphoryler des protéines présentant des structures primaires et secondaires variées (59, 402).

A

```

          *           20           *           40
IIALacS S.s. : HAVGIESEDGVIIVLIHVGIGTVKLGEGFIS~~~~~ : 31
IIALacS S.t. : HAVGIESEDGVIIVLIHVGIGTVKLNNGEGFIS~~~~~ : 31
IICBAGlc B.s. : HAIGLQSDGGRELLIHFGIDTVSLKGGEGFIS~~~~~ : 31
IICBAGlc S.p. : ~~FCIVTEAGLEVLVHIGLDTVSLEGKPFVHV~~~~~ : 31
IIABLMan S.s. : ~~~~~MGIGII--IASHG---KFAEGIHQSGSMIFGDQEK~ : 30
IIABHMan S.s. : ~~~~~MGIGII--IASHG---KFAEGIHQSGSMIFGEQEK~ : 30
IIAFru B.s. : ~~~~~MISVLI--ISGHG---DFPIALKESGSMIFGEENNL : 30
IIAGat E.c. : FPTGIMLEQHAIALPHCEAIHAKSSAIYLLR~~~~~ : 31
IIALac L.l.l. : EASG-EELPYSVTMMHGQDHLMTTILLKDVIIH~~~~~ : 31
IIAGut E.c. : FREGAPADLEEYCFIHCHEGELK GALHPGLQF~~~~~ : 31

```

B

```

          *           20           *           40           *           60
IIALacS : ~~~~~~ : -
IIALMan : MGIGIIIASHGKFAEGIHQSGSMIFGDQEKVQVVTMPSEGPDDLYAHFNDAIAQFDADD : 60

          *           80           *           100           *           120
IIALacS : ~~~~~~EELEHFFSMAISENEVKANVSLVNPTEGHLVILSSVN : 38
IIALMan : EILVLADLWSGSPFNQASRIAGENPDRKIATITG-----LNLPLMQAYTERMMIANATA :115

          *           140           *           160           *           180
IIALacS : DEHFAS-----GSMGKGFATKPTDGAVFAPISGTIRQVLPTRHAVGIESEDGVIVLIH : 91
IIALMan : EQVAANIIEKAKGCIKALPEEINDAEETTAAPVEA~~~~~ :150

          *           200           *           220           *           240
IIALacS : VGIGTVKLGEGFISYVEQGDRVEVGQKLEFWSPIIEKNGLDLDTVLVTVTNSEKFSAPFH :151
IIALMan : ~~~~~~ : -

          *           260
IIALacS : LEQEVGEEKVEALSEVITFKKGE :173
IIALMan : ~~~~~~ : -

```

Figure 47 : Alignement des séquences en acides aminés de domaines IIA. A, Alignement partiel de différents domaines IIA centré au niveau du résidu His phosphorylé par HPr(His~P). *S.s.* : *S. salivarius*, *S.t.* : *S. thermophilus*, *B.s.* : *B. subtilis*, *S.p.* : *S. pneumoniae*, *E.c.* : *E. coli*, *L.l.l.* : *L. lactis* ssp. *lactis*. B, Alignement complet des domaines IIA du transporteur du lactose LacS et de IIAB_L^{Man} de *S. salivarius*. Les portions en jaune représentent les résidus His phosphorylés par HPr(His~P) alors que les portions en vert correspondent à des résidus conservés ou similaires.

Dans la présente étude, nous avons montré clairement que HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P), un analogue structural de HPr(Ser-P)(His~P) (403), étaient en mesure de phosphoryler les enzymes IIAB^{Man}, des protéines du PTS impliquées dans le transport du glucose, du mannose, du fructose et du 2-DG chez les lactocoques et les streptocoques (355, 372). Afin de déterminer si le taux de transfert du groupement phosphorylé de HPr(Ser-P)(His~P) et HPr(S46D)(His~P) aux enzymes IIAB^{Man} de *S. salivarius* était

similaire à celui de HPr(His~P), des essais de cinétique ont été réalisés afin de mesurer les vitesses initiales de réaction. Les essais ont été conduits à 4°C, bien en dessous de la température à laquelle les cellules sont exposées *in vivo*, et à une concentration de HPr(Ser-P)(His~P) de près de 5 µM, une concentration qui est environ 50 à 100 fois inférieure à la concentration intracellulaire calculée (370). Malgré tout, les transferts des groupements phosphorylés de toutes les formes de HPr vers IIAB_L^{Man} ont atteint l'équilibre en moins de cinq secondes. Bien qu'il ait été impossible de calculer les vitesses initiales de réactions, ces résultats suggèrent que la forme doublement phosphorylée de HPr est en mesure de transférer efficacement son groupement phosphorylé à une protéine du PTS impliquée dans le transport des sucres et que le taux de transfert *in vivo* n'est probablement pas limitant. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Reizer *et al.* (293) où il a été démontré, de manière indirecte, que HPr(His~P) et HPr(Ser-P)(His~P) de *B. subtilis* sont en mesure de phosphoryler l'enzyme IIA^{Glc} de *B. subtilis* à la même vitesse. Compte tenu de la rapidité du transfert d'un groupement phosphorylé de HPr(Ser-P)(His~P) aux enzymes IIAB^{Man}, de la faible concentration de HPr et de HPr(His~P) chez la plupart des streptocoques et lactocoques lors de la croissance exponentielle et, enfin, de la forte concentration de la forme doublement phosphorylée, nous proposons que le transport de sucres par le PTS chez des cellules de streptocoques et de lactocoques en croissance exponentielle se fasse principalement, sinon exclusivement, *via* HPr(Ser-P)(His~P).

5.1.4.2 Régulation de l'activité enzymatique

HPr(His~P) est aussi en mesure de réguler, par phosphorylation réversible, l'activité de la glycérol kinase chez quelques bactéries à Gram positif (70). La phosphorylation de la GlpK active l'enzyme ce qui permet alors à la cellule de métaboliser le glycérol. Lorsqu'un sucre PTS est disponible, les concentrations cellulaires de HPr(His~P) chutent et la GlpK perd son groupement phosphorylé. La perte du groupement phosphorylé diminue l'activité de cette enzyme. Conséquemment, la phosphorylation réversible de la GlpK par HPr(His~P) permet à la cellule de métaboliser un sucre PTS préférentiellement au glycérol (70). Nos travaux ont montré que HPr(Ser-P)(His~P), contrairement à HPr(His~P), était incapable de transférer son groupement phosphorylé à la GlpK de *E. casseliflavus*. Ce résultat est en

accord avec le modèle d'exclusion du glycérol décrit ci-haut. En effet, le résultat contraire, soit la phosphorylation de la GlpK par HPr(Ser-P)(His~P) aurait signifié qu'en phase exponentielle de croissance, la GlpK serait phosphorylée, et donc active en tout temps chez les espèces bactériennes où cette forme est présente en forte concentration.

Les résultats obtenus soulèvent une question. En effet, la GlpK de *E. casseliflavus* n'est pas phosphorylée par HPr(His~P) de *E. casseliflavus* alors qu'elle l'est par les HPr(His~P) de *S. salivarius* et *B. subtilis* (Fig. 36). Ce résultat, contrairement à ce qui a été rapporté lors d'essais de phosphorylation de la GlpK en système hétérologue (50), suggère que la GlpK de *E. casseliflavus* ne serait pas activée par phosphorylation. Dans le but de vérifier s'il y avait une différence majeure entre les séquences des HPr utilisées, une comparaison des séquences en acides aminés des HPr de *B. subtilis*, de *E. casseliflavus* et de *S. salivarius* (Fig. 48) a été effectuée. La séquence en acides aminés de ces HPr présente un haut pourcentage de similarité (supérieur à 85%). Mentionnons tout de même que les résidus 2, 59 et 70 sont conservés chez *B. subtilis* et *S. salivarius* mais pas chez *E. casseliflavus* et que de ce groupe, le résidu en position 70 est impliqué chez *E. coli* dans l'autophosphohydrolyse, l'interaction de HPr avec les enzymes II et la catalyse du transfert du groupement phosphorylé aux domaines IIA de ces enzymes (183). Seul des expériences de mutagenèse dirigée pourrait permettre de déterminer si un ou plusieurs de ces résidus sont impliqués dans la reconnaissance HPr-GlpK.

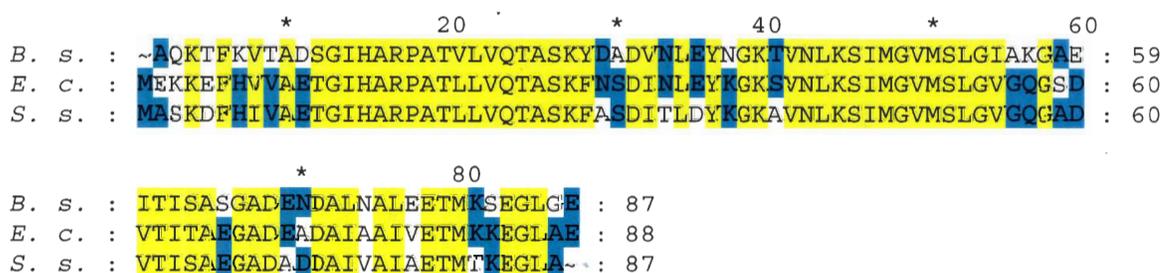


Figure 48 : Aligment complet des séquences en acides aminés des HPr de *B. subtilis* (*B. s.*), *E. casseliflavus* (*E. c.*) et *S. salivarius* (*S. s.*). Les portions surlignées représentent les résidus conservés ou similaires sur les trois séquences (jaune) ou sur deux d'entre elles (bleu).

5.2 Régulation de l'expression génétique par HPr(His~P) chez *S. salivarius*

5.2.1 Bref rappel

Il est établi que HPr(His~P), *via* la phosphorylation ou la déphosphorylation de régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD, participent à la régulation de l'expression des gènes. La présence de séquences RAT chez plusieurs streptocoques (*European Bioinformatics Institute*), séquence nécessaire à la régulation par les antiterminateurs PRD, suggère que HPr(His~P) pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la transcription chez ce genre bactérien. En conséquence, des travaux ont été exécutés afin de déterminer si HPr(His~P) étaient impliquées dans le contrôle de l'expression d'un certain nombre de gènes chez *S. salivarius*.

5.2.2 Approche méthodologique

5.2.2.1 Caractérisation du mutant *S. salivarius* G71

Afin de réaliser cette étude, la comparaison des protéomes de la souche parentale ATCC 25975 et du mutant G71, une souche EI⁻ incapable de produire HPr(His~P), a été faite en utilisant des cellules récoltées en phase exponentielle et stationnaire de croissance et ce, à la fois pour les protéines des extraits solubles et membranaires. Le mutant G71 a une mutation au niveau du gène *ptsI* résultant en l'insertion prématuré d'un codon d'arrêt. De ce fait, ce mutant est incapable de phosphoryler HPr sur son résidu His et, donc, ne produit ni HPr(His~P), ni HPr(Ser-P)(His~P), ce que nous avons confirmé expérimentalement.

Ce résultat impliquait que la souche G71 ne pouvait croître en présence d'un sucre PTS. Pour le démontrer, les temps de génération ont été mesurés avec des sucres PTS et non-PTS. Tel qu'attendu, aucune croissance de *S. salivarius* G71 n'a été observée en présence des sucres PTS glucose, mannose, saccharose et fructose. En revanche, le mutant avait des temps de génération similaire à la souche sauvage en présence des sucres non-PTS lactose, raffinose et mélibiose. La croissance était légèrement plus lente avec le galactose, également un sucre non-PTS, et aucune croissance n'a été observée sur maltose, un sucre dont le mode de transport chez *S. salivarius* était jusqu'à présent inconnu. L'incapacité de croître en présence de maltose suggérait que ce sucre était transporté dans la cellule *via* le

PTS ou que *S. salivarius* G71 était affectée d'une seconde mutation, inconnue, perturbant le transport ou le catabolisme du maltose. Dans le but de vérifier si le maltose était un sucre PTS chez *S. salivarius*, des essais de phosphorylation ont été entrepris avec des extraits membranaires de *S. salivarius* cultivé en présence de différents sucres. Les résultats obtenus suggèrent que, chez cette espèce, le maltose est transporté par le PTS. La présence d'un PTS maltose a été rapportée chez *Streptococcus sobrinus* (406) et, plus récemment, chez *S. mutans* (396). Qui plus est, l'analyse des génomes de plusieurs streptocoques montre la présence d'orthologues du transporteur PTS du maltose de *S. mutans*, MalT, chez *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *S. suis* (396). Ainsi, bien qu'il puisse exister plus d'une voie de transport du maltose chez les streptocoques (328, 396), les connaissances actuelles suggèrent que le maltose est transporté par le PTS chez ces bactéries.

Le mutant étant incapable de croître en présence d'un sucre PTS, le mélibiose a été choisi comme source d'énergie pour les cultures de *S. salivarius*. Le dosage des différentes formes de HPr a montré que les concentrations de HPr augmentent au cours de la croissance, passant de 35 µg de HPr par mg de protéines solubles en phase exponentielle de croissance à 115 µg de HPr par mg de protéines solubles en phase stationnaire de croissance chez la souche sauvage, et que la souche mutante possède environ 1,3 fois moins de HPr total par rapport à la souche sauvage. Cependant, nous avons observé que la quantité de HPr(Ser-P) était identique en phase exponentielle de croissance chez le mutant et la souche sauvage. De même, les résultats ont montré que les niveaux de HPr en phase exponentielle de croissance chez la souche sauvage cultivée en mélibiose étaient similaires à ceux obtenus après croissance sur un sucre PTS, soit une concentration élevée en HPr(Ser-P)(His~P), et de faibles niveaux en HPr et HPr(His~P). Enfin, en phase stationnaire de croissance, HPr(Ser-P) était absente autant chez la souche sauvage de *S. salivarius* que chez la souche mutante G71. Par ailleurs, la souche parentale contenait, dans ces conditions, des quantités appréciables de HPr(His~P) alors que le mutant G71 en était dépourvu.

5.2.2.2 À propos de HPr(Ser-P)

Chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C, HPr(Ser-P) est impliquée dans la répression et, à un moindre niveau, l'activation catabolique. Pour y arriver, deux molécules de HPr(Ser-P) vont interagir avec deux molécules de CcpA. Le complexe ternaire ainsi formé est alors en mesure de contrôler l'expression de gènes dont la région promotrice contient des séquences *cre* (voir section 1.3.3.2.2, page 41). Bien que plusieurs gènes identifiés chez le mutant G71 comme étant sur- ou sous-exprimés présentent une séquence *cre* au niveau de leur promoteur, l'implication de HPr(Ser-P) dans le contrôle de l'expression de ces gènes semble improbable. En effet, rappelons que chez la souche sauvage et le mutant G71, les concentrations cellulaires de HPr(Ser-P) étaient identiques en phase exponentielle de croissance alors que HPr(Ser-P) était absente chez les deux souches en phase stationnaire de croissance (voir Tableau 10, page 108). Ces résultats suggèrent que toutes modifications observées dans les profils protéomiques du mutant G71 en phase exponentielle et stationnaire de croissance ne peuvent être attribuées à HPr(Ser-P).

5.2.2.3 Analyse des protéomes par électrophorèse 2D

Les analyses des protéomes ont d'abord été faites par électrophorèse à deux dimensions suivie d'une coloration au nitrate d'argent. Cette technique par laquelle il est possible d'obtenir une image globale des protéines présentes dans une cellule à un moment donné, était largement utilisée lorsque cette étude a été entreprise (116, 136). En effet, les années 90 marquent la mise au point de substrat où le gradient de pH était fixé directement à l'acrylamide, permettant l'obtention de patrons de protéines reproductibles lors de l'étape de focalisation isoélectrique. De plus, de concert avec ces avancées technologiques, les développements dans le domaine de l'informatique ont permis la création de programmes permettant l'analyse rapide des profils protéiques et l'automatisation de la détection des protéines sur- ou sous-exprimées (205, 218). Enfin, l'explosion de l'information dans les banques de données publiques facilite d'autant l'identification des protéines sélectionnées lorsque ces dernières sont analysées par spectrométrie de masse ou par LC/MS/MS (86, 270).

Le seuil de détection des protéines par la coloration au nitrate d'argent est d'environ 1 ng (116). Cette méthode de détection des protéines est donc 10- à 100-fois supérieure à la coloration au bleu de Coomassie. La révélation des protéines est le résultat d'une réaction catalytique entre les molécules de nitrate d'argent et les résidus des protéines. En effet, la formaldéhyde catalyse la formation de ponts entre les chaînes latérales des acides aminés lysine et cystéine et, dans une moindre mesure, sérine et thréonine. Cependant, contrairement à la coloration avec des fluochromes ou le bleu de Coomassie, il a été démontré que la coloration au nitrate d'argent interfère avec l'analyse des protéines au spectromètre de masse (294). Cette interférence pourrait d'ailleurs expliquer la difficulté rencontrée à obtenir des identifications positives lors des analyses par LC/MS/MS des protéines.

Malgré toutes ces avancées, les profils protéiques obtenus suite à des analyses protéomiques par électrophorèses 2D présentent des variations qui peuvent être importantes d'un gel à l'autre. Plusieurs facteurs peuvent participer à cette variation. La présence de sels dans l'échantillon, la précipitation des protéines dans l'acétone, la quantité de protéines déposée sur le gel lors de la focalisation isoélectrique et la durée de la coloration au nitrate d'argent sont toutes des étapes préalables où des variations, même légères, peuvent s'accumuler. Dans le but de limiter ces variations, nous avons utilisé des échantillons qui avaient tous été dialysés contre un tampon à faible concentration saline avant que la concentration protéique ne soit mesurée en duplicata. De même, la précipitation à l'acétone était d'une durée minimale de 2 h afin d'optimiser la précipitation des protéines. Enfin, la durée de la coloration au nitrate d'argent a été strictement maintenue aux temps indiqués par le protocole.

Afin d'être incluse dans notre étude, une protéine devait présenter au minimum une variation moyenne de son intensité par un facteur deux lors des analyses comparatives des profils protéiques des souches ATCC 25975 et G71. Ces analyses reposaient sur l'étude d'un minimum de sept gels provenant d'un minimum de trois échantillons protéiques obtenus de trois cultures différentes pour chacune des souches et des conditions de croissance étudiées.

5.2.2.4 Analyse des protéomes par la méthode DiGe

En plus de l'analyse par électrophorèse 2D, les protéines extraites de cellules récoltées en phase stationnaire de croissance ont été soumises à une analyse par la méthode DiGe. Cette méthode est reconnue comme étant supérieure à l'électrophorèse 2D (221, 241). En effet, il est généralement accepté que les analyses des protéomes par électrophorèse 2D présentent moins de reproductibilité entre les gels ce qui mène à une variabilité accrue (221, 241). Brièvement, la technique DiGe consiste, dans un premier temps, à marquer les protéines des extraits cellulaires de chacune des souches étudiées avec des molécules fluorescentes de différentes couleurs (Cy3 et Cy5). Ensuite, les extraits cellulaires sont réunis et, tout comme pour l'analyse des protéomes par électrophorèse 2D, les protéines sont séparées en fonction de leur pI et de leur masse moléculaire. Les molécules fluorescentes sont excitées à leur longueur d'onde spécifique et les patrons obtenus sont superposés, puis analysés. Compte tenu que les échantillons migrent en même temps sur le même gel, les protéines de même nature provenant d'extraits cellulaires différents ne peuvent migrer de façon différente. Ainsi, l'analyse simultanée des extraits sur un même gel réduit de façon importante la variation entre les gels. Enfin, la présence d'un standard interne constitué du mélange de toutes les fractions analysées marquées à l'aide d'un troisième fluorochrome, permet l'obtention d'une carte où toutes les protéines, présentes dans tous les extraits, seront représentées. Ce standard interne, présent sur chaque gel, permet de diminuer les variations de données lors de la détermination des concentrations protéiques entre les différents gels (221). Au vu de ces variations moins importantes, il a été démontré qu'un nombre inférieur d'analyses de gels dérivé de DiGe permet l'obtention de valeurs statistiquement significatives (221). La méthode de détection des protéines a aussi un impact important sur les analyses de ces dernières. Alors que la limite de détection lors de la coloration au nitrate d'argent est environ de 1 ng, elle est de 25 pg pour les fluorochromes Cy3 et Cy5 (221). D'autre part, il a été démontré que la présence de lysine est primordiale lors de la révélation des protéines. En effet, ce sont ces résidus qui sont marqués par les colorants Cy3 et Cy5 (221, 241). Ainsi, une protéine présentant moins de lysines que la moyenne paraîtrait moins colorée par cette technique alors que l'absence de lysine ferait en sorte qu'une protéine ne serait pas détectée. Tout comme pour l'analyse par électrophorèse 2D, un seuil de variation

de deux a été établi pour considérer que l'expression d'une protéine était altérée chez le mutant.

Dans l'ensemble, ces éléments suggèrent que les proportions relatives des protéines obtenues lors des analyses des profils protéiques par électrophorèse 2D seraient plus variables que celles obtenues lors des analyses des profils protéiques par DiGe. Cette variabilité accrue, couplée à la difficulté d'identifier les protéines colorées au nitrate d'argent, est d'ailleurs probablement à l'origine des différences de résultats obtenus entre l'analyse 2D et l'analyse par DiGe. Par exemple, en phase stationnaire de croissance, la phosphate acétyltransférase était surexprimée par un facteur de 2,5 chez le mutant G71 et présentait une déviation standard de près de 30%. Si l'on suppose que les variations sont plus faibles par la méthode DiGe, il n'est pas impossible qu'une variation inférieure à deux ait été obtenue pour la phosphate acétyltransférase, ce qui expliquerait le fait que cette protéine n'a pas été identifiée comme étant sur- ou sous-exprimée chez le mutant en utilisant la méthode DiGe. De même, certaines protéines présentant des profils de migration similaire en 2D et en DiGe, pourraient être les mêmes mais l'absence d'identification ne permet pas de l'affirmer. Par exemple, la protéine #10 identifiée par la méthode d'analyse DiGe (voir Tableau 13, page 121) pourrait correspondre aux protéines #5 ou #16 identifiées par électrophorèse 2D (voir Tableau 12, page 117) alors que la fructokinase, identifiée suite aux analyses 2D (voir Tableau 12, page 117), présente un profil de migration similaire à celle de la protéine #4 identifiée par la méthode d'analyse DiGe (voir Tableau 13, page 121). Enfin, notons que les analyses par DiGe ont permis de détecter un plus grand nombre de protéines.

5.2.3 Contrôle de l'expression des gènes chez les cellules récoltées en phase exponentielle de croissance

En phase exponentielle de croissance, nous avons mesuré une concentration cellulaire de 1,6 µg de HPr(His~P) par mg de protéines solubles chez *S. salivarius* ATCC 25975 ce qui représente à peine 4% du HPr total. Cette quantité étant très faible comparativement à la quantité de HPr totale (36,3 µg), nous ne nous attendions donc pas à observer des différences importantes entre le protéome de la souche parentale et celui du mutant G71 qui

ne contient pas de HPr(His~P). Tel que mentionné précédemment, l'analyse du protéome de *S. salivarius* récolté en phase exponentielle de croissance a été effectuée uniquement par électrophorèse en deux dimensions. Au total, cinq protéines étaient surexprimées ou sous-exprimées par un facteur de deux ou plus chez le mutant. Quatre de ces protéines ont été identifiées : l'orotate phosphoribosyltransférase, la galactokinase, la 2-phosphoglycérate déshydratase et la GlnQ (Tableau 14). Avec plus de 230 protéines identifiées lors des analyses combinées des protéines solubles et insolubles, ce qui, si l'on compare à *S. thermophilus* (38, 220), correspondrait à environ 12% des protéines du protéome de *S. salivarius*, ce résultat suggère que l'absence de HPr(His~P) chez G71 n'affecte que l'expression d'un petit nombre de gènes. Comme la concentration de HPr(His~P) est faible chez la souche parentale, les gènes affectés seraient particulièrement sensibles aux variations de la concentration de HPr(His~P).

Tableau 14 : Protéines dont l'expression est modifiée chez les cellules du mutant G71 récoltées en phase exponentielle de croissance

Catégorie	Protéine	↑/↓ ^a	Rôles et fonctions
Biosynthèse des nucléotides	Orotate phosphoribosyltransférase	↓	- Métabolisme des pyrimidines servant à la synthèse des bases pyrimidiques cytosine, thymine et uracile
Métabolisme des sucres	Galactokinase	↓	- Catalyse la phosphorylation du galactose en galactose-1-phosphate
	2-phosphoglycérate déshydratase (énolase)	↑	- Catalyse la réaction réversible de la déshydratation du 2-phosphoglycérate en PEP - Impliquée dans des mécanismes de fixation et d'adhésion des cellules
Transport	GlnQ	↑	- Transport de la glutamine - Impliquée dans les mécanismes d'adhésion et de virulence

^a Les protéines surexprimées chez le mutant G71 sont identifiées par le symbole ↑, alors que les protéines sous-exprimées sont identifiées par le symbole ↓.

Nous savons que chez plusieurs bactéries à Gram positif l'opéron *pyr*, qui comprend entre autres le gène *pyrE* codant pour l'orotate phosphoribosyltransférase, est sous le contrôle de un ou deux régulateurs transcriptionnels (19, 172, 341). L'opéron *pyr* est contrôlé par le répresseur PyrR et les travaux de Jørgensen *et al.* (172) indiquent que l'expression de l'opéron *pyr* par PyrR est régulée par le *ratio* des nucléotides uridine et guanosine. En présence d'uridine, la constante de dissociation de PyrR à l'ARNm diminue alors qu'en présence de guanosine, elle augmente. Ainsi, si on suppose qu'un tel système de régulation

existe chez *S. salivarius*, ces données, de concert avec l'absence de séquence *cre* ou RAT en amont de l'opéron *pyr*, laissent croire que la diminution de l'expression de l'orotate phosphoribosyltransférase chez le mutant G71 ne serait pas contrôlée directement par HPr(His~P) mais plutôt par le régulateur PyR, peut être suite à un déséquilibre des *ratio* entre les nucléotides uridine et guanosine d'une souche à l'autre. De même, la galactokinase est encodée par le gène *galK* de l'opéron *gal* (374). Cet opéron est régulé par le régulateur GalR et est précédé d'une séquence *cre*. La présence d'une séquence consensus *cre* en amont de l'opéron *gal* chez *S. salivarius* pourrait indiquer que l'expression de cet opéron serait sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CcpA comme il l'a été démontré chez *L. lactis* (216). Par contre, un rôle de HPr(Ser-P) dans le contrôle de l'expression des gènes étant peu probable (voir section 5.2.2.2, page 142), ces résultats suggèrent que l'anomalie dans le contrôle de l'expression du gène codant pour la galactokinase chez G71 serait due principalement à l'action de l'activateur transcriptionnel, GalR, ou à un autre mécanisme inconnu.

L'enzyme glycolytique 2-phosphoglycérate déshydratase, aussi appelée émolase, catalyse la déshydratation du 2-phosphoglycérate en PEP lors de la glycolyse ou la réaction inverse lors de la néoglucogenèse. L'émolase pourrait aussi être impliquée dans des mécanismes de fixation et d'adhésion des cellules. Cette enzyme est retrouvée à la surface de plusieurs bactéries à Gram positif (34, 35, 91, 171, 197, 262) et, malgré l'absence de séquence signal et motif requis pour la fixation aux membranes (197), l'émolase se fixerait entre autres au plasminogène et aux acides lipotéichoïques (16, 171) lorsque le pH extracellulaire est acide (16). Tel que mentionné précédemment, aucune séquence RAT n'a été identifiée en amont du gène codant pour l'émolase. Cependant, des expériences menées chez un mutant IIAB^{Man} négatif de *S. mutans* montre que l'émolase y est dérégulée (3). Si on suppose qu'un système similaire de contrôle de l'expression des gènes est présent chez *S. salivarius*, l'absence de phosphorylation des EII chez le mutant G71, dû à l'absence de HPr(His~P) et de HPr(Ser-P)(His~P), suggère que la forme phosphorylée de l'enzyme IIAB^{Man} serait requise à la régulation négative du gène codant l'émolase.

Tout comme l'émolase, le transporteur GlnQ serait aussi impliqué dans les mécanismes d'adhésion et de virulence chez les streptocoques de groupe B (344). En effet, une

diminution de plus de 90% de l'adhésion des bactéries à la fibronectine, un récepteur présent à la surface de cellules épithéliales (345), a été observé chez un mutant *glnQ*. Néanmoins, le rôle du transporteur serait indirect. En effet, il a été démontré que l'expression de certains gènes pouvait être régulée par l'altération des niveaux intracellulaires des acides aminés (29, 62) et particulièrement par la glutamine (32, 90, 165). En support à cette hypothèse, l'analyse de divers mutants semble indiquer que le métabolisme des acides aminés auraient un rôle à jouer à l'adhérence bactérienne à la fibronectine (344).

5.2.3.1 Précision quant aux rôles de HPr(His~P), HPr(Ser-P)(His~P) et des enzymes II dans le contrôle de l'expression des gènes durant la phase exponentielle de croissance

Selon la littérature, HPr(His~P) peut contrôler l'expression de gènes *via* la phosphorylation de régulateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD (voir section 1.3.3.1.3, page 29). En phase exponentielle de croissance, la forme HPr(His~P) représente à peine 4% du HPr total chez *S. salivarius*. Ainsi, au vue de cette faible concentration, nous avons proposé que les gènes affectés étaient particulièrement sensibles aux variations de la concentration de HPr(His~P). L'étude révèle une absence de séquences RAT en amont des différents gènes sur- ou sous-exprimés chez le mutant G71. Ce résultat suggère que ces derniers ne seraient pas contrôlés *via* un antitermineur contenant des domaines PRD. En revanche, rien ne permet d'exclure que les gènes soient sous le contrôle d'activateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD.

La forme doublement phosphorylée de HPr représente 65% des HPr chez la souche sauvage en phase exponentielle de croissance. Puisque cette forme de HPr est absente chez le mutant G71, la question se pose à savoir si les gènes sur- ou sous-exprimés chez le mutant G71 ne seraient pas sous le contrôle de HPr(Ser-P)(His~P). Cependant, dans l'état actuel des connaissances, cette option semble peu probable. En effet, nous savons que HPr(Ser-P) participe à la régulation transcriptionnelle de gènes sous le contrôle de la répression catabolique en formant un complexe ternaire impliquant la protéine régulatrice CcpA et les séquences d'ADN *cre* présentes dans les régions promotrices des opérons cibles (71, 129).

Bien qu'aucune étude n'ait été faite pour déterminer si HPr(Ser-P)(His~P) était en mesure de remplacer HPr(Ser-P) dans le phénomène d'exclusion d'inducteur, il a été clairement démontré chez *B. subtilis* que HPr(Ser-P)(His~P) ne peut se lier à CcpA (74). Sachant que les structures de HPr ont été résolues par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire et par cristallographie pour *E. coli* (378, 379), *E. faecalis* (24, 167, 232), *B. subtilis* (143, 170), *S. carnosus* (173, 244) et *S. aureus* (233) et que, dans l'ensemble, la structure tertiaire de HPr est bien conservée chez ces bactéries (150, 166), il semble peu probable que la forme doublement phosphorylée de HPr régule la transcription de gènes *via* CcpA chez les streptocoques et les lactocoques. De la même façon, chez les bactéries à Gram positif, HPr(His~P) est impliquée dans la régulation d'activateurs ou d'antiterminateurs transcriptionnels ayant des domaines PRD par phosphorylation de résidus His (337, 380). Malgré l'identification putative de plusieurs régulateurs transcriptionnels à domaine PRD chez les streptocoques et les lactocoques (8, 38, 39, 85, 114, 152, 350, 351, 397), le rôle et le mode d'action de ces régulateurs demeurent peu documentés chez ces bactéries. En revanche, chez *B. subtilis*, la forme doublement phosphorylée du HPr est pratiquement incapable de phosphoryler *in vitro* le régulateur transcriptionnel PRD LicT (207). Globalement, ces données suggèrent que HPr(Ser-P)(His~P) ne serait pas en mesure de phosphoryler les protéines à PRD.

Enfin, le contrôle de l'expression de certains gènes, en phase exponentielle de croissance, pourrait être sous le contrôle des enzymes II. En effet, nous avons observé que l'absence de phosphorylation des enzymes IIAB^{Man} chez le mutant G71, dû à l'absence de HPr(His~P) et de HPr(Ser-P)(His~P), pourrait être responsable du contrôle de l'expression du gène codant pour l'énolase. Cette voie de contrôle est tout à fait plausible. En effet, il a été observé que la protéine IIAB^{Man} participait à la régulation de l'expression des gènes chez *S. salivarius* (43, 195, 269) et participe dans la régulation d'au moins 38 gènes chez *S. mutans* (4). De même, l'étude des gènes sous le contrôle de IIAB^{Man} chez *S. mutans* révèle que cette dernière jouerait un rôle clé dans le métabolisme énergétique, possiblement en étant en mesure de ressentir les niveaux énergétiques de la cellule ou encore la disponibilité des sucres puis, en réponse à ces informations, elle pourrait réguler l'activité de facteurs de transcription et de transporteurs de sucres (3). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré

que des enzymes II étaient en mesure de phosphoryler les domaines PRD de certains activateurs et antiterminateurs transcriptionnels (voir section 1.3.3.1.3, page 29). Le mélibiose, un sucre non PTS, étant employée lors de cette étude, le PTS devrait être peu ou pas actif. De même, bien que la concentration en HPr(His~P) soit faible, nous avons démontré que le produit doublement phosphorylé était en mesure de transférer son groupement phosphoryle aux IIAB^{Man} (voir section 3.2.2, page 94). Ainsi, l'absence d'activité du PTS couplée à la concentration élevée en produit doublement phosphorylé et à la capacité de HPr(Ser-P)(His~P) à phosphoryler les domaines IIA des enzymes II suggèrent que, chez *S. salivarius* ATCC 25975, ces dernières seront en grande partie phosphorylées en phase exponentielle de croissance. À l'inverse, les enzymes IIA seraient dans un état déphosphorylé chez le mutant G71.

5.2.4 Contrôle de l'expression des gènes chez les cellules récoltées en phase stationnaire de croissance

En phase stationnaire de croissance, les cellules de la souche sauvage ne contiennent pas de HPr(Ser-P) ni de HPr doublement phosphorylé, mais contiennent cependant des quantités importantes de HPr(His~P), quantités qui peuvent représenter jusqu'à 25% du HPr total. Comme les cellules du mutant G71 ne contiennent pas de HPr(His~P), l'étude des protéomes des deux souches récoltées en phase stationnaire de croissance devrait donner un meilleur éclairage quant à l'ampleur du rôle que joue HPr(His~P) dans le contrôle de l'expression génétique chez *S. salivarius*. Il est bon, cependant, de rappeler qu'en phase stationnaire de croissance, les protéines IIA et IIB du PTS, dont IIAB^{Man}, sont, chez la souche sauvage, dans un état phosphorylé puisque les cellules contiennent des quantités abondantes de HPr(His~P) et que le PTS n'est pas actif. À l'inverse, tout comme durant la phase exponentielle de croissance, les enzymes II seront dans un état déphosphorylé chez le mutant G71 puisque cette bactérie ne synthétise pas de HPr(His~P). Sachant que la protéine IIAB^{Man} semble jouer un rôle dans la régulation d'un certain nombre de gènes chez les streptocoques (4, 43, 195, 269), il devient impossible de déterminer si les protéines dont l'expression est altérée chez le mutant G71 sont encodées par des gènes sous le contrôle direct de HPr(His~P), IIAB^{Man}, ou sous un contrôle mixte faisant intervenir les deux protéines. Cependant, comme les streptocoques ne semblent accumuler des quantités

élevées de HPr(His~P) que lorsque les cellules cessent de croître ou croissent lentement (369), nous proposons que la présence de HPr(His~P) en fortes concentrations dans les cellules constitue un signal intracellulaire indiquant que le milieu extérieur n'offre plus des conditions propices à la croissance. Dans de telles conditions, la cellule doit s'adapter en modifiant l'expression d'un certain nombre de gènes dont l'expression serait contrôlée directement ou indirectement par HPr(His~P). Comme le mutant G71 ne synthétise pas de HPr(His~P), les protéines dont la synthèse est augmentée ou diminuée chez le mutant au cours de la phase stationnaire de croissance, ferait partie d'un ensemble de protéines dont l'expression, sous le contrôle de HPr(His~P), doit être ajustée à la hausse ou à la baisse suite à l'apparition dans le milieu d'éléments défavorables à la croissance comme une carence en source d'énergie ou un pH trop acide.

L'étude des protéomes de *S. salivarius* ATCC 25975 et du mutant G71 récoltées en phase stationnaire a été effectuée à l'aide de deux techniques différentes, soit par gel d'électrophorèse 2D et par DiGe. Les analyses des profils protéiques par gel d'électrophorèse 2D ont révélées la présence de 270 et 300 protéines chez *S. salivarius* ATCC 25975 et *S. salivarius* G71, respectivement. Ce nombre était de 1403 protéines lors de la première analyse par DiGe et de 1884 lors de la deuxième. Sachant que les trois génomes connus de *S. thermophilus* codent respectivement pour 1915, 1710 et 1889 protéines (38, 220) et partant du principe qu'un nombre similaire de protéines seraient codées sur le génome de *S. salivarius*, ces résultats suggèrent que plus de 80% des protéines sont révélées par DiGe contrairement à environ 15% par électrophorèse 2D suivie d'une coloration au nitrate d'argent. Ce nombre est conséquent avec la limite de détection des colorants employés. En effet, alors que la limite de détection lors de la coloration au nitrate d'argent est environ de 1 ng, elle est de 25 pg pour les fluorochromes Cy3 et Cy5 (221). À la suite de ces analyses, 38 protéines, dont les niveaux variaient par un facteur minimal de deux, ont été observées. De ce nombre, 28 protéines ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF et 16 protéines ont pu être identifiées avec certitude (Tableau 15).

Tableau 15 : Protéines dont l'expression est modifiée chez des cellules du mutant G71 récoltées en phase stationnaire de croissance

Catégorie	Protéine	↑/↓ ^a	Rôles et fonctions
Biosynthèse des acides aminés	α-isopropylmalate isomérase	↓	- Impliquée dans la voie de biosynthèse de la leucine à partir du pyruvate.
	Glutamate déshydrogénase (NADP(+)) putative	↓	- Catalyse la réaction réversible de la transformation du glutamate en 2-oxoglutarate. - Impliquée dans la voie de biosynthèse du glutamate.
Biosynthèse des nucléotides	Phosphoribosylformyl-glycinamide synthase	↑	- Participe à la voie de synthèse des purines aux dépens de l'acide aminé Gln.
	Carbamoyl-phosphate synthétase, sous-unité large	↓	- Impliquée dans le métabolisme des pyrimidines, une molécule azotée hétérocyclique dont les dérivés principaux sont les bases pyrimidiques cytosine, thymine et uracile.
Métabolisme des sucres	Fructokinase	↓	- Catalyse la phosphorylation du fructose aux dépens de l'ATP pour former du fructose-6-phosphate.
	Glucose-6-phosphate isomérase	↓	- Catalyse la conversion réversible du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.
	Phosphate acétyltransférase	↑	- Forme une voie clé menant à la synthèse de l'intermédiaire métabolique acétylcoenzyme A, à partir d'acétate ou encore permet la formation d'ATP à partir d'acétylcoenzyme A excédentaire.
	Chaîne β d'une acétoïne déshydrogénase putative	↑	- Catalyse la conversion réversible du diacétyl en acétoïne. - Participe à la régulation du ratio NAD ⁺ /NADH.
	Phosphoglycérate kinase	↑	- Synthèse de phosphoglycérate et d'ATP aux dépens du bisphosphoglycérate et de l'ADP dans la voie de la glycolyse.
	L-Lactate déshydrogénase	↑	- Catalyse la réaction réversible de la production de lactate à partir d'une molécule de pyruvate.
Régulation	Pyrophosphatase inorganique Mn-dépendante putative	↓	- Clive le pyrophosphate en deux molécules de phosphate inorganique.
	Protéase Clp ATP-dépendante	↓	- Participe à la dégradation de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides aminés aromatiques ou avec branchement, des purines et des pyrimidines.
Transport	Transporteur de sucre ABC, protéine fixatrice de l'ATP	↑	- Sous-unité d'un complexe assurant le transport de sucre(s) aux dépens de l'ATP
	Transporteur ABC, <i>multiple sugar-binding</i> , protéine fixatrice de l'ATP	↑	- Sous-unité d'un complexe assurant le transport de sucre(s) aux dépens de l'ATP
Autre	Protéine hypothétique conservée	↑	- Fonction inconnue.
	Dipeptidase	↑	- Xaa-Pro aminopeptidase.

^a Les protéines surexprimées chez le mutant G71 sont identifiées par le symbole ↑, alors que les protéines sous-exprimées sont identifiées par le symbole ↓.

5.2.4.1 Métabolisme et transport des sucres

Huit protéines impliquées dans le métabolisme ou le transport des sucres ont été identifiées lors de cette étude. La fructokinase et la glucose-6-phosphate isomérase étaient les seules à être sous-exprimées chez le mutant G71. Tel que mentionné précédemment, ces deux enzymes sont étroitement liées. En effet, elles catalysent la formation de fructose-6-phosphate, l'un des précurseurs dans la voie de la glycolyse. Chez *Lactobacillus fermentum*, les gènes codants pour ces deux enzymes sont présents sur l'opéron *fruIK* (138). Cet opéron est précédé de deux séquences *cre* putatives, suggérant que ces gènes sont régulés négativement par la CCR. L'analyse des génomes montre que chez *S. mutans*, le gène codant pour la fructokinase, *scrK*, est présent sur un opéron codant, entre autres, pour la mannose-6-phosphate isomérase alors que chez *S. thermophilus*, les deux protéines sont codées par deux gènes sous le contrôle de promoteurs différents. L'absence de HPr(Ser-P) en phase stationnaire de croissance suggère que la voie de la CCR CcpA-dépendante n'est pas impliquée dans le cas présent (71, 129). Enfin, bien que, chez les bactéries lactiques, aucune séquence *cre* ou RAT n'ait été rapportée au niveau de l'opéron *scr* (284), rien ne peut l'exclure chez *S. salivarius*. Ainsi, il se pourrait que ces gènes soient contrôlés par un activateur transcriptionnel PRD activé par HPr(His~P).

Quatre protéines impliquées dans le métabolisme des sucres, étaient surexprimées chez le mutant G71 soit la phosphate acétyltransférase, l'acétoïne déshydrogénase, la phosphoglycérate kinase et la lactate déshydrogénase. La phosphate acétyltransférase participe à la synthèse d'acétylcoenzyme A ou, dans le cas de la réaction inverse, permet la synthèse d'ATP (163). Chez *B. subtilis*, l'expression du gène *pta*, codant pour la phosphate acétyltransférase, est activée en présence du régulateur transcriptionnel CcpA (280, 331). De même, l'acétoïne déshydrogénase serait aussi sous le contrôle de CcpA chez *B. subtilis* (407). La phosphoglycérate kinase catalyse la synthèse de phosphoglycérate et d'ATP aux dépens du bisphosphoglycérate et de l'ADP dans la voie de la glycolyse alors que la lactate déshydrogénase catalyse la réaction réversible de la réduction du pyruvate pour former du lactate. Ces deux enzymes sont surexprimées chez *Lactobacillus rhamnosus* lorsque cette dernière est soumise à des conditions stressantes (279). De plus, le gène codant pour la lactate déshydrogénase est sous le contrôle de CcpA chez *B. subtilis*, *S. bovis* et *L. lactis*

(22, 358, 404). Chez *S. mutans*, la phosphoglycérate kinase et la lactate déshydrogénase sont déréprimées chez un mutant incapable de synthétiser IIAB^{Man} alors que l'acétoïne déshydrogénase y est réprimée (3). En supposant qu'un système de contrôle de l'expression des gènes similaire existe chez *S. salivarius*, ces résultats suggèrent que chez cette espèce, la phosphorylation de IIAB^{Man} serait requise pour la régulation négative des gènes codant pour la phosphoglycérate kinase, la lactate déshydrogénase ainsi que l'acétoïne déshydrogénase.

Bien que nous ayons identifié deux transporteurs de sucre ABC, aucune information n'est disponible quant aux sucres transportés. Par homologie de séquence, nous avons déduit que l'un des transporteurs assurerait la fixation et le transport de plusieurs types de sucre et serait un composant de l'opéron *msm*, opéron reconnu pour être induit en présence de mélibiose, un α -galactoside, chez *S. mutans* (6). D'ailleurs, chez cette bactérie, quatre transporteurs ABC, dont le transporteur de sucre codé par l'opéron *msm*, sont déréprimés chez un mutant IIAB^{Man} négatif (3). Enfin, notons que, chez *B. subtilis*, plusieurs transporteurs de sucre ABC sont régulés par CcpA (248, 250).

Plusieurs des protéines mentionnées ci-haut pourraient être sous le contrôle de CcpA. L'absence à la fois chez la souche parentale et chez le mutant de HPr(Ser-P), nécessaire au mécanisme de fixation de CcpA aux séquences *cre*, de même que l'absence de mutation sur le gène *ccpA* et de son promoteur chez le mutant G71, suggère que ce type de régulation n'est pas responsable de la surexpression de ces protéines chez le mutant G71. En revanche, des études menées chez *S. mutans* (3, 4) suggèrent que certaines de ces protéines pourraient être contrôlées non pas par HPr(His~P), mais plutôt par IIAB^{Man}~P. Partant du principe que les protéines, dont l'expression est perturbée chez G71, constitueraient un ensemble de protéines où la concentration cellulaire est ajustée en phase stationnaire de croissance pour permettre à la cellule de survivre à des conditions non propices à la croissance comme une carence en source d'énergie ou un pH trop acide, l'épuisement des sources de carbone en phase stationnaire de croissance et le ralentissement du métabolisme de la cellule expliqueraient les besoins moindres de *S. salivarius* pour des enzymes pouvant catalyser la synthèse d'ATP comme la phosphate acétyltransférase et la phosphoglycérate kinase. Par ailleurs, dans l'éventualité où les conditions permettraient une reprise de la

croissance, les enzymes catalysant les premières étapes de la glycolyse, comme la fructokinase et la glucose-6-phosphate, pourraient être maintenues à des niveaux plus élevés. De même, afin de se protéger contre l'acidification du milieu environnant, des mécanismes pourraient être activés afin de limiter la production de lactate en diminuant la concentration de la lactate déshydrogénase. Il est intéressant de noter que la phosphate acétyltransférase, l'acétoïne déshydrogénase et la lactate déshydrogénase sont toutes trois surexprimées chez le mutant et font toutes parties de voies participant à la dissipation du pyruvate chez *S. thermophilus* (149) et *L. lactis* (261). De même, des travaux effectués chez *L. lactis* (356) montrent, en phase stationnaire de croissance, une inhibition de l'activité de la pyruvate kinase couplée à une augmentation de la concentration intracellulaire de PEP. L'inhibition de l'activité de la pyruvate kinase aurait comme résultat de réduire la synthèse de pyruvate. La cellule n'ayant plus besoin des enzymes participant aux voies de dissipation du pyruvate, aura développée des mécanismes pour contrôler l'expression des gènes codant pour ces protéines. Nous proposons qu'un mécanisme similaire existe chez *S. salivarius*. Ainsi, la cellule conserverait des niveaux importants en PEP en phase stationnaire afin d'être en mesure de répondre à tout changement dans son environnement qui lui permettrait de reprendre rapidement la croissance. Enfin, l'absence de source d'énergie dans le milieu environnant pourrait expliquer la diminution de la concentration des transporteurs de sucres ABC chez *S. salivarius*.

5.2.4.2 Régulation et biosynthèse des nucléotides

La protéase Clp, sous-exprimée chez le mutant G71, est impliquée dans la réponse au stress chez *S. mutans* (68) et participe à la virulence de *S. pneumoniae* (162). Chez *B. subtilis*, elle permettrait de réguler à la baisse les voies métaboliques cellulaires et donc, participerait à l'adaptation des cellules à un environnement où il y a absence de source de carbone (112). En effet, en début de phase stationnaire de croissance, l'expression de plusieurs gènes est modifiée et une augmentation de la dégradation de protéines est observée (112). Ainsi, en phase stationnaire de croissance, plusieurs protéines participant à l'utilisation de sources de carbone alternatives ainsi que des protéines liées dans la néoglucogenèse sont surexprimées chez *B. subtilis* (36). De même, en phase stationnaire de croissance, la protéase Clp participe à la dégradation de plusieurs enzymes impliquée dans la biosynthèse d'acides

aminés, des purines et des pyrimidines (112). De ce fait, l'augmentation de la concentration de cette protéase chez la souche sauvage pourrait donc avoir des impacts sur la concentration des enzymes participant à ces voies métaboliques. La protéase Clp semble être contrôlée par une voie indirecte ou indépendante de HPr(His~P). Chez *B. subtilis*, *L. monocytogenes* et *S. mutans*, le gène codant pour la protéase Clp est sous le contrôle du répresseur CtsR (155, 181, 199) qui serait lui-même régulé par une tyrosine kinase et son activateur (181). Le répresseur CtsR serait présent chez *S. thermophilus*.

La phosphoribosylformylglycinamidine synthase participe à la voie de synthèse des purines aux dépens de l'acide aminé Gln. Sa présence accrue chez le mutant coïncide avec la diminution de la concentration de la Clp, une protéase qui dégrade cette enzyme de la voie de synthèse des purines chez *B. subtilis* lorsque cette dernière approche la phase stationnaire de croissance (112). Ces données suggèrent que la concentration plus importante de cette enzyme chez le mutant G71 serait en partie le résultat de la diminution de l'activité de la protéase Clp.

La carbamoyl-phosphate synthétase, impliquée dans la biosynthèse des pyrimidines, est aussi reconnue par la protéase Clp chez *B. subtilis* (112). Cependant, la carbamoyl-phosphate synthétase étant, tout comme la protéase Clp, sous exprimée chez le mutant G71, il semble peu probable que cette diminution dans la concentration cellulaire de la carbamoyl-phosphate synthétase résulte en une dégradation accrue de cette enzyme chez le mutant par la protéase Clp. Il a été établi, chez *L. lactis*, que le gène *carB*, codant pour la carbamoyl-phosphate synthétase, est régulé par un mécanisme d'atténuation sensible à la présence dans le milieu de culture de pyrimidines comme l'uracile (227). Ainsi, en présence d'uracile dans le milieu de culture, l'expression du gène *carB* est réprimée. Par ailleurs, ce mécanisme d'atténuation serait similaire à celui observé pour l'opéron *pyr* de *B. subtilis* (214, 366), codant entre autres pour l'orotate phosphorybosyltransférase, une protéine qui est sous-exprimée chez le mutant en phase exponentielle de croissance (voir Tableau 14, page 146). Il est d'ailleurs proposé que chez *L. lactis*, le gène *carB* est sous le contrôle d'un régulateur homologue à PyrR (227). Ces résultats suggèrent qu'en phase stationnaire de croissance, la concentration d'uracile dans le milieu de culture de la souche sauvage diminuerait alors qu'elle demeurerait élevée chez le mutant G71, expliquant la

répression de l'expression du gène codant pour la carbamoyl-phosphate synthétase. Nous proposons que ce phénomène résulte de la dégradation des molécules d'uracile en réponse à l'acidification du milieu extracellulaire. En effet, la cellule ne se divisant plus, elle peut se permettre de dégrader l'uracile afin de libérer des molécules d'ammoniac dans le milieu qui vont, à leur tour, partiellement neutraliser l'acidité du milieu. Advenant qu'une voie de contrôle similaire existe chez *S. salivarius*, le mécanisme régulant l'expression de ce gène serait alors contrôlée par une voie indirecte ou indépendante de la concentration HPr(His~P) ou de toute autres formes de HPr.

5.2.4.3 Biosynthèse des acides aminés

L' α -isopropylmalate isomérase est réprimée chez le mutant G71 en phase stationnaire de croissance. C'est une enzyme de la voie de synthèse de la leucine, qui est elle même dérivée de la voie de synthèse de la valine. Chez *B. subtilis*, l'opéron *ilv-leu* est régulé positivement par CcpA et négativement par les régulateurs TnrA et CodY (359). De même, il a été démontré qu'une concentration élevée en GTP active le répresseur CodY (359). Chez *S. thermophilus*, les protéines liées à la biosynthèse de la leucine sont codées par les gènes de l'opéron *leuABCD*. Sachant que *S. thermophilus*, une espèce phylogénétiquement rapprochée de *S. salivarius*, code pour un répresseur transcriptionnel CodY et, par association, en supposant qu'un système de régulation similaire à *B. subtilis* soit opérationnel, il se pourrait que la répression de l' α -isopropylmalate isomérase chez le mutant G71 résulte d'une concentration accrue en GTP. En effet, si l'on suppose que les concentrations des différentes formes de HPr permettent à la cellule de percevoir le niveau énergétique de son environnement et à s'y adapter, le mutant ne serait pas en mesure de répondre adéquatement à l'absence de source d'énergie dans son environnement. Ainsi, la surexpression de la phosphoribosylformylglycinamide synthase chez *S. salivarius* G71 (voir Tableau 15, page 152) pourrait mener à une augmentation de la concentration en GTP chez cette souche. En conséquence, la répression de l' α -isopropylmalate isomérase chez le mutant G71 résulterait de l'action d'un régulateur homologue à CodY, lui-même activé par une augmentation de la concentration en GTP. Ce résultat suggère que, chez la souche sauvage, il y aurait, lorsque les cellules cessent de croître, une diminution de la concentration de GTP ce qui empêcherait la répression de l'opéron *leuABCD* par le

répresseur CodY. Notons qu'aucune séquence RAT n'a été rapportée au niveau du promoteur de l'opéron *ilv-leu* ni de l'opéron *leuABCD*.

La glutamate déshydrogénase (NADP(+)) de *S. salivarius* est sous-exprimée chez le mutant G71. Cette enzyme catalyse la réaction réversible de la transformation du glutamate en 2-oxoglutarate. La réaction inverse menant à la formation de glutamate permet la séquestration d'ammoniac. En phase stationnaire de croissance, plusieurs protéines sont dégradées, libérant, entre autres, des molécules de glutamate. Celles-ci seraient rapidement dégradées par la glutamate déshydrogénase afin de libérer des molécules d'ammoniac en réponse à l'acidification du milieu extracellulaire. De même, dès que les conditions permettraient la reprise de la croissance cellulaire, la glutamate déshydrogénase participerait à la récupération des molécules azotés. Chez *B. subtilis*, *rocG*, le gène codant pour la glutamate déshydrogénase, est réprimé en présence du régulateur transcriptionnel CcpA, de HPr(Ser-P) et de Crh (30).

5.2.4.4 Contrôle autogène de l'opéron *pts*?

Au cours de notre étude, nous avons observé une variation quant à la concentration totale de HPr entre les souches sauvages et mutantes. En effet, nous avons observé une augmentation dans la concentration totale de HPr entre les cellules récoltées en phase exponentielle de croissance et celles récoltées en phase stationnaire de croissance. De même, nous avons observé que les niveaux de HPr chez la souche sauvage étaient toujours plus élevés par un facteur de 1,3 et ce, peu importe à quel moment les cellules étaient récoltées. Afin de déterminer si les différences observées au niveau des concentrations totales de HPr chez la souche sauvage et chez le mutant G71 résultaient d'un contrôle de la transcription de l'opéron *pts*, nous avons procédé à des expériences de type Northern. Chez des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance, les résultats ont montré que le transcrit de 2,1 kb, résultant de la transcription des gènes *ptsHI*, était plus intense chez le mutant alors que le transcrit de 0,5 kb, correspondant à la transcription du gène *ptsH*, était moins abondant chez le mutant que chez la souche sauvage. Tel que déjà proposé (99, 184), ces résultats suggèrent que la structure tige et boucle du terminateur T₀, située après le gène *ptsH* (Fig. 41, page 109), pourrait être contrôlée par un élément de régulation transcriptionnel. La région promotrice de l'opéron *pts* et l'espace intergénique entre les

gènes *ptsH* et *ptsI* étant identique chez les deux souches, ce contrôle pourrait être le fruit d'un facteur *trans*-régulateur lié à HPr (99). D'ailleurs, les travaux antérieurs effectués chez *S. salivarius* L26, un mutant présentant une délétion d'une paire de base au niveau du gène *ptsH* résultant en une protéine fusion HPr-EI, font état d'un patron de transcrits pour l'opéron *pts* similaire à celui retrouvé chez G71 (99). Les auteurs ont alors proposé qu'un facteur *trans*-régulateur était probablement sous le contrôle de HPr. En effet, chez ce mutant, il y a absence de HPr libre alors que l'EI est présente. Contrairement à la souche L26, le mutant G71 est incapable de synthétiser du EI. Cependant, il maintient une concentration d'environ 25 µg de HPr par mg de protéines solubles. Ainsi, alors que les travaux présent et passé (99) suggèrent une implication de HPr dans la régulation au niveau de T₀, les données présentés ici viennent préciser que HPr(Ser-P) n'est probablement pas impliquée dans ce mécanisme de contrôle transcriptionnel au niveau du terminateur T₀. En effet, HPr(Ser-P) est présente à des concentrations similaires chez la souche sauvage et le mutant G71.

En phase stationnaire de croissance, nous observons une diminution des transcrits *pts* chez le mutant par un facteur 20 par rapport à la souche sauvage. Deux possibilités peuvent expliquer ce phénomène; il pourrait y avoir i) arrêt de la transcription, et/ou ii) une différence quant à la stabilité des ARNm. Sachant qu'en phase stationnaire de croissance, tous les transcrits *pts* sont affectés par cette diminution chez le mutant G71, il est peu probable que le mécanisme de contrôle soit le même que celui observé en phase exponentielle où seul un des deux transcrits était réprimé. Ces résultats suggèrent qu'en phase stationnaire, il y aurait répression au niveau du promoteur P₁ de l'opéron *pts*. Compte tenu que dans ces conditions, il y a chez la souche sauvage une très forte concentration de HPr(His~P), il serait tentant de proposer que l'opéron *pts* est contrôlé au niveau du promoteur P₁ par un antiterminateur ou un activateur de la transcription comme les régulateurs contenant les domaine PRD. Cependant, le contrôle par un antiterminateur semble peu probable vue qu'aucune séquence terminatrice n'est observée au niveau du promoteur P₁ de l'opéron *pts*. Ainsi, le contrôle au niveau du promoteur P₁ devrait se faire *via* l'activité d'un activateur transcriptionnel. Par ailleurs, des analyses de séquences ont démontré la présence d'une potentielle séquence *cre* au niveau du promoteur de l'opéron *pts* chez les streptocoques (243, 370). Aucune étude n'est venue démontrer si cette

séquence était reconnue ou non par CcpA. Par contre, l'absence de HPr(Ser-P) en phase stationnaire de croissance suggère qu'il est peu probable que l'opéron *pts* soit sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CcpA au cours de cette période.

La diminution de la concentration des transcrits *pts* chez le mutant G71 en phase stationnaire de croissance n'est pas reliée à une diminution importante de la concentration de la protéine HPr. En fait, entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance, la concentration en HPr croît de 25 à 88 μg de HPr par mg de protéines solubles et le *ratio* entre la souche sauvage et le mutant demeure constant tout au long de la croissance à environ 1,3. Cette observation peut paraître contradictoire. Cependant, comme proposé par Nilsson *et al.* (258), la concentration cellulaire des transcrits devrait être comparée au taux de synthèse des protéines plutôt qu'à leur concentration intracellulaire. En effet, le taux de synthèse d'une protéine n'est pas simplement le reflet de sa concentration intracellulaire, elle découle d'un équilibre entre la synthèse et la disparition de la protéine qui peut elle-même être causée par la dégradation de la protéine et sa dilution suite à la division cellulaire (Fig. 49) (55, 83). Compte tenu qu'en phase stationnaire de croissance, le taux de dilution de HPr devient nul (absence de division cellulaire), il ne reste plus que le taux de dégradation de la protéine qui peut avoir un impact sur sa concentration. De même, les proportions très faibles d'ARNm en phase stationnaire de croissance pourraient être associées à une dégradation rapide des ARNm chez le mutant G71. En effet, bien qu'il n'existe aucune valeur précise chez les bactéries lactiques, la demi-vie moyenne des ARNm chez *E. coli* est d'à peine 1 min (55, 255). Ainsi, une dégradation rapide des transcrits *pts* couplée à une dégradation faible de la protéine HPr pourrait expliquer le résultat observé.

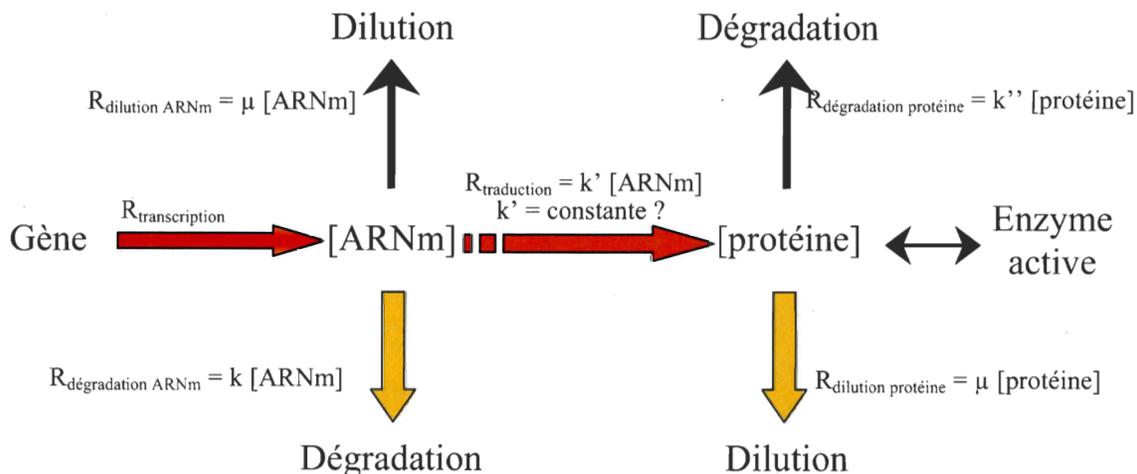


Figure 49 : Facteurs cinétiques influençant la concentration cellulaire et le taux de synthèse d'une protéine. μ , taux de croissance; k , constante de dégradation de l'ARNm; k' efficacité de la traduction; k'' , constante de dégradation de la protéine. Figure tirée de Even *et al.* (83) avec autorisation.

Finalement, notons que les opérons *pts* des bactéries à Gram positif et à faible contenu en G+C présentent une région en 5' non traduite (370). Cette région, variant de 29 à 97 nucléotides selon l'espèce, serait en mesure de former des structures secondaires qui auraient pour rôle de stabiliser l'ARNm (54). Chez *S. salivarius*, l'importance de cette région a déjà été observée. En effet, la transversion d'une base C pour une base A dans cette région décroît les concentrations cellulaires de HPr et EI et rend la cellule insensible à la répression catabolique par le glucose ou le fructose (370). Ce résultat suggère que cette région joue un rôle important dans l'expression de l'opéron *pts* chez *S. salivarius*. Cette région étant identique chez les deux souches à l'étude, il semble improbable que cette dernière soit impliquée dans la diminution importante de la transcription de l'opéron *pts* chez le mutant G71, sauf si on suppose que cette région interagit avec HPr(His~P).

5.3 Conclusion

Bien que l'existence possible de la forme doublement phosphorylée ait été rapportée *in vitro* en 1984 (72, 289), il aura fallu attendre sept ans avant d'avoir des observations concrètes de sa présence *in vivo* chez des streptocoques (369). Il faudra attendre plus de dix ans avant l'apparition d'étude portant sur les rôles et fonctions que HPr(Ser-P)(His~P) pourrait exercer *in vivo* (56, 202). L'absence de la forme doublement phosphorylée *in vivo* chez deux modèles très étudiés des bactéries à Gram positif et à faible contenu en G+C, *B.*

subtilis et *E. faecalis*, pourrait expliquer, du moins en partie, les délais importants quant à la sortie d'études portant sur les rôles et fonctions de cette phospho-forme de HPr. Dans la présente étude, nous avons mesuré les proportions *in vivo* des différentes formes de HPr chez 15 bactéries différentes dont certaines avaient déjà fait l'objet d'étude quant à la présence de HPr(Ser-P)(His~P). Globalement, nous avons observé que la forme doublement phosphorylée est présente chez toutes les espèces de streptocoques et de lactocoques étudiées alors qu'elle est virtuellement absente chez *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. faecalis*.

En accord avec les travaux de Casabon *et al.* (48), nos résultats suggèrent que les bactéries à Gram positif et à faible contenu en G+C, incapable de maintenir leur pH intracellulaire près de la neutralité lorsque le pH extracellulaire diminue, sont en mesure de produire et maintenir des concentrations élevées en HPr(Ser-P)(His~P) en phase exponentielle de croissance. De même, les bactéries qui maintiennent leur pH intracellulaire près de la neutralité, comme *B. subtilis*, *E. faecalis* et *S. aureus*, produisent peu ou pas de HPr doublement phosphorylée. Enfin, cette étude suggère que HPr(Ser-P)(His~P) serait, à l'exception du transfert de son groupement phosphorylé vers les domaines IIA, incapable d'effectuer les fonctions attribuées à HPr(His~P). En effet, nos résultats montrent pour la première fois que HPr(Ser-P)(His~P) est en mesure, *in vitro*, de phosphoryler efficacement les domaines IIA des complexes d'enzymes II suggérant que cette forme de HPr participe au transport des sucres chez les bactéries la produisant. En revanche, il a été démontré que la forme doublement phosphorylée de HPr n'était pas en mesure de réguler le transport du glycérol *via* la phosphorylation de la glycérol kinase. Enfin, la littérature propose que HPr(Ser-P)(His~P) n'a, au mieux, qu'un rôle restreint dans la régulation des gènes par la phosphorylation d'activateurs ou d'antiterminateurs transcriptionnels contenant des domaines PRD et est incapable de se fixer à CcpA.

Nous proposons que chez les bactéries à Gram positif à faible contenu en G+C capable de produire de fortes concentrations de HPr(Ser-P)(His~P), la synthèse du produit doublement phosphorylé de HPr pourrait servir à neutraliser les formes actives de HPr. Ainsi, en appui à HPr(His~P), présente en faible concentration chez les souches récoltées en phase exponentielle de croissance, HPr(Ser-P)(His~P) participerait au transport des sucres *via* le

PTS par phosphorylation des domaines IIA sans toutefois interférer dans les mécanismes d'exclusion d'inducteur *via* l'activation, par phosphorylation, d'enzymes impliquées dans le catabolisme de source d'énergie comme la GlpK. De même, la synthèse de HPr(Ser-P)(His~P) servirait à réduire la concentration de HPr(Ser-P), qui peut atteindre plus de 90% chez les organismes incapable de synthétiser le produit doublement phosphorylé. Ceci pourrait servir à contrôler les mécanismes de répression catabolique en abaissant de façon plus ou moins importante la concentration de HPr(Ser-P), diminuant d'autant ses interactions avec le régulateur transcriptionnel CcpA. Enfin, la diminution de la concentration de HPr(Ser-P) pourrait avoir un impact sur les mécanismes d'exclusion d'inducteur découlant des interactions allostériques de HPr(Ser-P) avec les transporteurs de sucres non-PTS là où ces mécanismes existent.

Dans le but de déterminer l'implication de HPr(His~P) dans l'expression des gènes, l'analyse des profils protéiques de la souche sauvage de *S. salivarius* et d'un mutant EI négatif a été entreprise. En effet, le mutant présentait des concentrations similaires en HPr(Ser-P) mais était incapable de synthétiser du HPr(His~P) et du HPr(Ser-P)(His~P). L'utilisation de ce mutant a d'ailleurs permis de confirmer pour la première fois que *S. salivarius* transporte le maltose *via* le PTS. Peu de protéines ont été exprimées différemment en phase exponentielle de croissance. Il apparaît donc que l'absence de HPr(His~P) chez le mutant G71 n'affecte que l'expression d'un nombre restreint de gènes chez les cellules en phase exponentielle de croissance. De plus, les concentrations de HPr(His~P) étant faibles chez la souche parentale, les gènes affectés seraient particulièrement sensibles aux variations de la concentration de HPr(His~P).

En phase stationnaire de croissance, les analyses ont été effectuées à la fois par électrophorèse 2D et par la méthode d'analyse DiGe. Ainsi, il a été possible d'estimer que 1% à 2% des protéines sont différemment exprimées chez le mutant G71. Par ailleurs, à l'exception de la phosphoglycérate kinase, les analyses des profils protéiques par la méthode DiGe n'a pas permis de détecter les protéines identifiées par analyse d'électrophorèse 2D. Rappelons enfin que la moitié des protéines identifiées participe au transport ou au métabolisme des sucres. Globalement, les résultats obtenus suggèrent que la concentration de certaines protéines, dont les fonctions peuvent être liées à une reprise

rapide de la croissance lorsque les conditions redeviennent propices, serait régulée par divers signaux intracellulaire dont la présence de HPr(His~P) ou de IIAB^{Man}~P, eux même dépendant du niveau énergétique de l'environnement. De même, nous avons observé une diminution de la concentration de la protéase Clp chez la souche mutante. Cette dernière est impliquée dans la dégradation de plusieurs enzymes en phase stationnaire de croissance chez *B. subtilis* (112) et dans la réponse au stress chez *S. mutans* (68). En absence de cette protéase, certaines enzymes des voies de la synthèse de pyrimidines ou de purines, nécessaire lors de la division cellulaire, ont été observées en plus grande concentration chez la souche mutante. Enfin, on retrouve des concentrations plus élevées d'enzymes participant à la synthèse de l'ATP et de transporteurs de sucres de type ABC alors qu'il n'y a plus de sucres dans le milieu de culture. Malgré tout, outre la présence putative de séquence *cre*, aucune séquence RAT n'a été observée en amont des gènes codant pour les protéines identifiées présentes dans les banques de données. Compte tenu de l'absence de HPr(Ser-P) en phase stationnaire autant chez le mutant que chez la souche sauvage, il semble peu probable que les protéines surexprimées et sous-exprimées soient sous le contrôle de la répression catabolique *via* le régulateur CcpA. Cependant, il a été démontré que CcpA était en mesure d'interagir avec Crh et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et que, ces complexes étaient en mesure de contrôler l'expression d'un nombre limité de gènes (252, 273). La question se pose alors à savoir si un autre cofacteur protéiques seraient en mesure d'interagir avec CcpA chez *S. salivarius*.

En plus du rôle probable de HPr(His~P) dans la régulation de certains gènes chez *S. salivarius*, les résultats supportent la thèse selon laquelle la protéine IIAB^{Man} y participerait aussi. En effet, six protéines contrôlées par IIAB^{Man} chez *S. mutans* (4) étaient sous- ou surexprimées chez *S. salivarius* G71. Ces protéines sont toutes impliquées dans le métabolisme ou le transport des sucres. Si nous supposons que l'expression des gènes codant pour ces protéines est régulée par un mécanisme similaire à celui observé chez *S. mutans*, les résultats suggèrent que chez *S. salivarius*, IIAB^{Man}~P exercerait un contrôle négatif sur l'expression des gènes. Compte tenu que les régulateurs transcriptionnels LevR, SacY et GlcT de *B. subtilis* ainsi que LacT de *L. casei* sont contrôlés négativement *via* la

phosphorylation de leurs domaines PRD par les enzymes II (61, 223, 339), il est tentant de penser qu'un mécanisme similaire prévaut chez *S. salivarius*.

5.4 Perspectives

En perspective, il serait intéressant de mettre au point une technique qui permettrait la détermination des différentes formes de HPr chez les lactobacilles et de vérifier chez un plus grand échantillon de lactocoques si ces derniers sont tous en mesure de synthétiser la forme doublement phosphorylée de HPr. De même, avec l'identification, à partir de banques de données, de plusieurs régulateurs transcriptionnels putatifs portant des domaines PRD, ils seraient intéressant de vérifier si l'absence de phosphorylation des domaines PRD par HPr(Ser-P)(His~P) est un phénomène répandu ou non. Enfin, à la lumière des analyses des profils protéiques de *S. salivarius* ATCC 25975 et G71, il serait pertinent de créer un mutant EI négatif stable ainsi qu'un mutant IIAB^{Man} négatif et de reprendre les analyses par DiGe autant en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance. Une telle étude permettrait de distinguer les protéines sous le contrôle de IIAB^{Man} de celles sous le contrôle de HPr(His~P). De la même façon afin d'accroître le succès de l'identification des protéines identifiées par DiGe, l'obtention de la séquence complète des génomes des souches sauvage et du mutant G71 pourrait être effectuée. Finalement, une analyse transcriptionnelle globale, *via* l'utilisation de puces à ADN, viendrait conclure brillamment cette étude.

Bibliographie

1. **Abramson, J., H. R. Kaback, et S. Iwata.** 2004. Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**:413-419.
2. **Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, et S. Iwata.** 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**:610-615.
3. **Abranches, J., M. M. Candella, Z. T. Wen, H. V. Baker, et R. A. Burne.** 2006. Different roles of EIIAB^{Man} and EII^{Glc} in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **188**:3748-3756.
4. **Abranches, J., Y. Y. Chen, et R. A. Burne.** 2003. Characterization of *Streptococcus mutans* strains deficient in EIIAB^{Man} of the sugar phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4760-4769.
5. **Abranches, J., M. M. Nascimento, L. Zeng, C. M. Browngardt, Z. T. Wen, M. F. Rivera, et R. A. Burne.** 2008. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **190**:2340-2349.
6. **Aduse-Opoku, J., L. Tao, J. J. Ferretti, et R. R. Russell.** 1991. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* alpha-galactosidase. *J. Gen. Microbiol.* **137**:757-764.
7. **Agre, P., M. Bonhivers, et M. J. Borgnia.** 1998. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.* **273**:14659-14662.
8. **Ajdić, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savić, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, S. Lin, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najar, H. Lai, J. White, B. A. Roe, et J. J. Ferretti.** 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:14434-14439.
9. **Alodehou, S.** 2005. Caractérisation de protéines phosphorylées par IIAB_L^{Man}, une protéine du système de transport des sucres phosphotransférase-phosphoénolpyruvate-dépendant chez *Streptococcus salivarius*. Université Laval, Québec.
10. **Alpert, C. A., M. Dörschug, D. Saffen, R. Frank, J. Deutscher, et W. Hengstenberg.** 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. Chromatogr.* **326**:363-371.

11. **Altermann, E., W. M. Russell, M. A. Azcarate-Peril, R. Barrangou, B. L. Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobson, T. Duong, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano, et T. R. Klaenhammer.** 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. **102**:3906-3912.
12. **Anderson, J. W.** 1995. HPr: a model protein. Biochem. Cell. Biol. **73**:219-222.
13. **Anderson, J. W., P. Bhanot, F. Georges, R. E. Klevit, et E. B. Waygood.** 1991. Involvement of the carboxy-terminal residue in the active site of the histidine-containing protein, HPr, of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. Biochemistry **30**:9601-9607.
14. **Anderson, J. W., K. Pullen, F. Georges, R. E. Klevit, et E. B. Waygood.** 1993. The involvement of the arginine 17 residue in the active site of the histidine-containing protein, HPr, of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **268**:12325-12333.
15. **Anderson, J. W., E. B. Waygood, M. H. Saier, Jr., et J. Reizer.** 1992. Properties of phosphorylated protein intermediates of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Biochem. Cell Biol. **70**:242-246.
16. **Antikainen, J., V. Kupannen, K. Lähteenmäki, et T. K. Korhonen.** 2007. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. J. Bacteriol. **189**:4539-4543.
17. **Arnaud, M., M. Débarbouillé, G. Rapoport, M. H. Saier, Jr., et J. Reizer.** 1996. *In vitro* reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **271**:18966-18972.
18. **Arnaud, M., P. Vary, M. Zagorec, A. Klier, M. Débarbouillé, P. Postma, et G. Rapoport.** 1992. Regulation of the *sacPA* operon of *Bacillus subtilis*: identification of phosphotransferase system components involved in SacT activity. J. Bacteriol. **174**:3161-3170.
19. **Arsène-Ploetze, F., V. Kugler, J. Martinussen, et F. Bringel.** 2006. Expression of the *pyr* operon of *Lactobacillus plantarum* is regulated by inorganic carbon availability through a second regulator, PyrR2, homologous to the pyrimidine-dependent regulator PyrR1. J. Bacteriol. **188**:8607-8616.
20. **Asanuma, N., et T. Hino.** 2003. Molecular characterization of HPr and related enzymes, and regulation of HPr phosphorylation in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. Arch. Microbiol. **179**:205-213.
21. **Asanuma, N., T. Yoshii, et T. Hino.** 2004. Molecular characteristics of phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system in *Streptococcus bovis*. Curr. Microbiol. **49**:4-9.
22. **Asanuma, N., T. Yoshii, et T. Hino.** 2004. Molecular characterization of CcpA and involvement of this protein in transcriptional regulation of lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. Appl. Environ. Microbiol. **70**:5244-5251.
23. **Attwood, P. V., M. J. Piggott, X. L. Zu, et P. G. Besant.** 2007. Focus on phosphohistidine. Amino Acids **32**:145-156.
24. **Audette, G. F., R. Engelmann, W. Hengstenberg, J. Deutscher, K. Hayakawa, J. W. Quail, et L. T. Delbaere.** 2000. The 1.9 Å resolution structure of phosphoserine 46 HPr from *Enterococcus faecalis*. J. Mol. Biol. **303**:545-553.

25. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, et K. Struhl.** 1997. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, N.Y.
26. **Aymerich, S., et M. Steinmetz.** 1992. Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**:10410-10414.
27. **Barabote, R. D., et M. H. Saier, Jr.** 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **69**:608-634.
28. **Barrangou, R., E. Altermann, R. Hutkins, R. Cano, et T. R. Klaenhammer.** 2003. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**:8957-8962.
29. **Beckmann, C., J. D. Waggoner, T. O. Harris, G. S. Tamura, et C. E. Rubens.** 2002. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. Infect. Immun. **70**:2869-2876.
30. **Belitsky, B. R., H. J. Kim, et A. L. Sonenshein.** 2004. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. J. Bacteriol. **186**:3392-3398.
31. **Ben-Zeev, E., L. Fux, O. Amster-Choder, et M. Eisenstein.** 2005. Experimental and computational characterization of the dimerization of the PTS-regulation domains of BglG from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **347**:693-706.
32. **Bender, R. A., et B. Magasanik.** 1977. Regulatory mutations in the *Klebsiella aerogenes* structural gene for glutamine synthetase. J. Bacteriol. **132**:100-105.
33. **Beres, S. B., E. W. Richter, M. J. Nagiec, P. Sumby, S. F. Porcella, F. R. DeLeo, et J. M. Musser.** 2006. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**:7059-7064.
34. **Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal, et S. Hammerschmidt.** 2001. α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. Mol. Microbiol. **40**:1273-1287.
35. **Bergmann, S., M. Rohde, K. T. Preissner, et S. Hammerschmidt.** 2005. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. Thromb. Haemost. **94**:304-311.
36. **Bernhardt, J., J. Weibezahn, C. Scharf, et M. Hecker.** 2003. *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. Genome Res. **13**:224-237.
37. **Blencke, H. M., G. Homuth, H. Ludwig, U. Mäder, M. Hecker, et J. Stülke.** 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Metab. Eng. **5**:133-149.
38. **Bolotin, A., B. Quinquis, P. Renault, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, S. Kulakauskas, A. Lapidus, E. Goltsman, M. Mazur, G. D. Pusch, M. Fonstein, R. Overbeek, N. Kyprides, B. Purnelle, D. Prozzi, K. Ngui, D. Masuy, F. Hancy, S. Burteau, M. Boutry, J. Delcour, A. Goffeau, et P. Hols.** 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Nat. Biotechnol. **22**:1554-1558.

39. **Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malmgren, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, et A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**:731-753.
40. **Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel, et P. Agre.** 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:425-458.
41. **Bourassa, S., L. Gauthier, R. Giguère, et C. Vadeboncoeur.** 1990. A III^{Man} protein is involved in the transport of glucose, mannose, and fructose by oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**:288-297.
42. **Breeuwer, P., J. Drocourt, F. M. Rombouts, et T. Abee.** 1996. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:178-183.
43. **Brochu, D., L. Trahan, M. Jacques, M. C. Lavoie, M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 1993. Alterations in the cellular envelope of spontaneous III^{Man}_L-defective mutants of *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1291-1300.
44. **Brochu, D., et C. Vadeboncoeur.** 1999. The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J. Bacteriol.* **181**:709-717.
45. **Brokx, S. J., J. Talbot, F. Georges, et E. B. Waygood.** 2000. Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *In vitro* intragenic complementation: the roles of Arg126 in phosphoryl transfer and the C-terminal domain in dimerization. *Biochemistry* **39**:3624-3635.
46. **Brückner, R., et F. Titgemeyer.** 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:141-148.
47. **Bruno, W. J., N. D. Succi, et A. L. Halpern.** 2000. Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* **17**:189-197.
48. **Casabon, I., M. Couture, K. Vaillancourt, et C. Vadeboncoeur.** 2006. Synthesis of HPr(Ser-P)(His~P) by enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*. *Biochemistry* **45**:6692-6702.
49. **Chang, A. B., R. Lin, W. K. Studley, C. V. Tran, et M. H. Saier, Jr.** 2004. Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **21**:171-181.
50. **Charrier, V., E. Buckley, D. Parsonage, A. Galinier, E. Darbon, M. Jaquinod, E. Forest, J. Deutscher, et A. Claiborne.** 1997. Cloning and sequencing of two enterococcal *glpK* genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J. Biol. Chem.* **272**:14166-14174.
51. **Chauvin, F., L. Brand, et S. Roseman.** 1996. Enzyme I: the first protein and potential regulator of the bacterial phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* **147**:471-479.
52. **Chauvin, F., A. Fomenkov, C. R. Johnson, et S. Roseman.** 1996. The N-terminal domain of *Escherichia coli* enzyme I of the phosphoenolpyruvate/glycose phosphotransferase system:molecular cloning and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:7028-7031.

53. **Chico-Calero, I., M. Suárez, B. González-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel, et J. A. Vázquez-Boland.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:431-436.
54. **Coburn, G. A., et G. A. Mackie.** 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**:55-108.
55. **Cocaign-Bousquet, M., S. Even, N. D. Lindley, et P. Loubière.** 2002. Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**:24-32.
56. **Cochu, A., D. Roy, K. Vaillancourt, J. D. Lemay, I. Casabon, M. Frenette, S. Moineau, et C. Vadeboncoeur.** 2005. The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser-P)(His~P), is abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His~P). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1364-1372.
57. **Cochu, A., C. Vadeboncoeur, S. Moineau, et M. Frenette.** 2003. Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5423-5432.
58. **Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity, et J. M. Tiedje.** 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* **35**:D169-D172.
59. **Cornilescu, G., B. R. Lee, C. C. Cornilescu, G. Wang, A. Peterkofsky, et G. M. Clore.** 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.
60. **Cote, C. K., et A. L. Honeyman.** 2003. The LicT protein acts as both a positive and a negative regulator of *loci* within the *bgl* regulon of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **149**:1333-1340.
61. **Crutz, A. M., M. Steinmetz, S. Aymerich, R. Richter, et D. Le Coq.** 1990. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **172**:1043-1050.
62. **Csonka, L. N.** 1988. Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* **170**:2374-2378.
63. **Darbon, E., K. Ito, H. S. Huang, T. Yoshimoto, S. Poncet, et J. Deutscher.** 1999. Glycerol transport and phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation of glycerol kinase in *Thermus flavus*. *Microbiology* **145**:3205-3212.
64. **de Boer, M., C. P. Broekhuizen, et P. W. Postma.** 1986. Regulation of glycerol kinase by enzyme III^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **167**:393-395.
65. **Débarbouillé, M., I. Martin-Verstraete, A. Klier, et G. Rapoport.** 1991. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both

- sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**:2212-2216.
66. **Declerck, N., H. Dutartre, V. Receveur, V. Dubois, C. Royer, S. Aymerich, et H. van Tilbeurgh.** 2001. Dimer stabilization upon activation of the transcriptional antiterminator LicT. J. Mol. Biol. **314**:671-681.
 67. **Declerck, N., F. Vincent, F. Hoh, S. Aymerich, et H. van Tilbeurgh.** 1999. RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: functional and structural comparison of the CAT domain from SacY and LicT. J. Mol. Biol. **294**:389-402.
 68. **Deng, D. M., J. M. ten Cate, et W. Crielaard.** 2007. The adaptive response of *Streptococcus mutans* towards oral care products: involvement of the ClpP serine protease. Eur. J. Oral Sci. **115**:363-370.
 69. **Deutscher, J., B. Bauer, et H. Sauerwald.** 1993. Regulation of glycerol metabolism in *Enterococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of glycerol kinase catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. J. Bacteriol. **175**:3730-3733.
 70. **Deutscher, J., C. Francke, et P. W. Postma.** 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**:939-1031.
 71. **Deutscher, J., A. Galinier, et I. Martin-Verstraete.** 2002. Carbohydrate uptake and metabolism., p. 129-150. Dans A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, et R. J. Losick, *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C.
 72. **Deutscher, J., U. Kessler, C. A. Alpert, et W. Hengstenberg.** 1984. Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function. Biochemistry **23**:4455-4460.
 73. **Deutscher, J., U. Kessler, et W. Hengstenberg.** 1985. Streptococcal phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. J. Bacteriol. **163**:1203-1209.
 74. **Deutscher, J., E. Küster, U. Bergstedt, V. Charrier, et W. Hillen.** 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. **15**:1049-1053.
 75. **Deutscher, J., B. Pevec, K. Beyreuther, H. H. Kiltz, et W. Hengstenberg.** 1986. Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. Biochemistry **25**:6543-6551.
 76. **Deutscher, J., et M. H. Saier, 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. U.S.A. **80**:6790-6794.
 77. **Deutscher, J., et H. Sauerwald.** 1986. Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. J. Bacteriol. **166**:829-836.

78. **Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M. G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H. A. Carleton, E. F. Mongodin, G. F. Sensabaugh, et F. Perdreau-Remington.** 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**:731-739.
79. **Djordjevic, G. M., J. H. Tchieu, et M. H. Saier, Jr.** 2001. Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:3224-3236.
80. **Dossonnet, V., V. Monedero, M. Zagorec, A. Galinier, G. Pérez-Martínez, et J. Deutscher.** 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.
81. **Elferink, M. G., A. J. Driessen, et G. T. Robillard.** 1990. Functional reconstitution of the purified phosphoenolpyruvate-dependent mannitol-specific transport system of *Escherichia coli* in phospholipid vesicles: coupling between transport and phosphorylation. *J. Bacteriol.* **172**:7119-7125.
82. **Ercolini, D., V. Fusco, G. Blaiotta, et S. Coppola.** 2005. Sequence heterogeneity in the *lacSZ* operon of *Streptococcus thermophilus* and its use in PCR systems for strain differentiation. *Res. Microbiol.* **156**:161-172.
83. **Even, S., N. D. Lindley, et M. Cacaïgn-Bousquet.** 2001. Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* **183**:3817-3824.
84. **Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:613-630.
85. **Ferretti, J. J., W. M. McShan, D. Ajdić, D. J. Savić, G. Savić, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najjar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe, et R. McLaughlin.** 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:4658-4663.
86. **Fey, S. J., et P. M. Larsen.** 2001. 2D or not 2D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**:26-33.
87. **Fiegler, H., J. Bassias, I. Jankovic, et R. Brückner.** 1999. Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J. Bacteriol.* **181**:4929-4936.
88. **Fiulaine, S., S. Morera, S. Poncet, I. Mijakovic, A. Galinier, J. Janin, J. Deutscher, et S. Nessler.** 2002. X-ray structure of a bifunctional protein kinase in complex with its protein substrate HPr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:13437-13441.
89. **Fiulaine, S., S. Morera, S. Poncet, V. Monedero, V. Gueguen-Chaignon, A. Galinier, J. Janin, J. Deutscher, et S. Nessler.** 2001. X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J.* **20**:3917-3927.
90. **Fink, D., D. Falke, W. Wohlleben, et A. Engels.** 1999. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamine synthetase I by an adenylyltransferase. *Microbiology* **145**:2313-2322.
91. **Fluegge, K., O. Schweier, E. Schiltz, S. Batsford, et R. Berner.** 2004. Identification and immunoreactivity of proteins released from *Streptococcus agalactiae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:818-824.

92. **Fortina, M. G., G. Ricci, D. Mora, S. Guglielmetti, et P. L. Manachini.** 2003. Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3238-3243.
93. **Foucaud, C., et B. Poolman.** 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* **267**:22087-22094.
94. **Frey, N., S. Nessler, S. Fieulaine, K. Vaillancourt, M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 2003. The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: a hexameric bifunctional enzyme controlled by glycolytic intermediates and inorganic phosphate. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:67-72.
95. **Friesen, R. H., J. Knol, et B. Poolman.** 2000. Quaternary structure of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus* in the detergent-solubilized and membrane-reconstituted state. *J. Biol. Chem.* **275**:33527-33535.
96. **Froger, A., J. P. Rolland, P. Bron, V. Lagrée, F. Le Cahérec, S. Deschamps, J. F. Hubert, I. Pellerin, D. Thomas, et C. Delamarche.** 2001. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. *Microbiology* **147**:1129-1135.
97. **Froger, A., B. Tallur, D. Thomas, et C. Delamarche.** 1998. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci.* **7**:1458-1468.
98. **Fu, D., A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, et R. M. Stroud.** 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**:481-486.
99. **Gagnon, G., C. Vadeboncoeur, L. Gauthier, et M. Frenette.** 1995. Regulation of *ptsH* and *ptsI* gene expression in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Mol. Microbiol.* **16**:1111-1121.
100. **Gagnon, G., C. Vadeboncoeur, R. C. Levesque, et M. Frenette.** 1992. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the *ptsI* gene encoding enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase transport system from *Streptococcus salivarius*. *Gene* **121**:71-78.
101. **Galinier, A., J. Haiech, M. C. Kilhoffer, M. Jaquinod, J. Stülke, J. Deutscher, et I. Martin-Verstraete.** 1997. The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:8439-8444.
102. **Galinier, A., J. P. Lavergne, C. Geourjon, S. Fieulaine, S. Nessler, et J. M. Jault.** 2002. A new family of phosphotransferases with a P-loop motif. *J. Biol. Chem.* **277**:11362-11367.
103. **Garcia-Alles, L. F., C. Siebold, T. L. Nyffeler, K. Flükiger-Brühwiler, P. Schneider, H. B. Bürgi, U. Baumann, et B. Erni.** 2004. Phosphoenolpyruvate- and ATP-dependent dihydroxyacetone kinases: covalent substrate-binding and kinetic mechanism. *Biochemistry* **43**:13037-13045.
104. **Garrett, D. S., Y. J. Seok, A. Peterkofsky, A. M. Gronenborn, et G. M. Clore.** 1999. Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr. *Nat. Struct. Biol.* **6**:166-173.
105. **Garrity, L. F., S. L. Schiel, R. Merrill, J. Reizer, M. H. Saier, Jr., et G. W. Ordal.** 1998. Unique regulation of carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis* by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein McpC. *J. Bacteriol.* **180**:4475-4480.

106. **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154**:1-9.
107. **Gauthier, L., S. Bourassa, D. Brochu, et C. Vadeboncoeur.** 1990. Control of sugar utilization in oral streptococci. Properties of phenotypically distinct 2-deoxyglucose-resistant mutants of *Streptococcus salivarius*. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**:352-359.
108. **Gauthier, L., S. Thomas, G. Gagnon, M. Frenette, L. Trahan, et C. Vadeboncoeur.** 1994. Positive selection for resistance to 2-deoxyglucose gives rise, in *Streptococcus salivarius*, to seven classes of pleiotropic mutants, including *ptsH* and *ptsI* missense mutants. *Mol. Microbiol.* **13**:1101-1109.
109. **Gauthier, M., D. Brochu, L. D. Eltis, S. Thomas, et C. Vadeboncoeur.** 1997. Replacement of isoleucine-47 by threonine in the HPr protein of *Streptococcus salivarius* abrogates the preferential metabolism of glucose and fructose over lactose and melibiose but does not prevent the phosphorylation of HPr on serine-46. *Mol. Microbiol.* **25**:695-705.
110. **Geertsma, E. R., R. H. Duurkens, et B. Poolman.** 2005. The activity of the lactose transporter from *Streptococcus thermophilus* is increased by phosphorylated IIA and the action of beta-galactosidase. *Biochemistry* **44**:15889-15897.
111. **Geertsma, E. R., R. H. Duurkens, et B. Poolman.** 2005. Functional interactions between the subunits of the lactose transporter from *Streptococcus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **350**:102-111.
112. **Gerth, U., H. Kock, I. Kusters, S. Michalik, R. L. Switzer, et M. Hecker.** 2008. Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**:321-331.
113. **Ginsburg, A., et A. Peterkofsky.** 2002. Enzyme I: the gateway to the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**:273-278.
114. **Glaser, P., C. Rusniok, C. Buchrieser, F. Chevalier, L. Frangeul, T. Msadek, M. Zouine, E. Couvé, L. Lalioui, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, et F. Kunst.** 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol. Microbiol.* **45**:1499-1513.
115. **Gonzy-Tréboul, G., J. H. de Waard, M. Zagorec, et P. W. Postma.** 1991. The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for II^{Glc} and III^{Glc} domains. *Mol. Microbiol.* **5**:1241-1249.
116. **Görg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, et W. Weiss.** 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**:1037-1053.
117. **Görke, B.** 2003. Regulation of the *Escherichia coli* antiterminator protein BglG by phosphorylation at multiple sites and evidence for transfer of phosphoryl groups between monomers. *J. Biol. Chem.* **278**:46219-46229.
118. **Görke, B., L. Fraysse, et A. Galinier.** 2004. Drastic differences in Crh and HPr synthesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**:2992-2995.
119. **Görke, B., et B. Rak.** 1999. Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* **18**:3370-3379.

120. **Gosalbes, M. J., C. D. Esteban, et G. Pérez-Martínez.** 2002. *In vivo* effect of mutations in the antiterminator LacT in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* **148**:695-702.
121. **Gosalbes, M. J., V. Monedero, et G. Pérez-Martínez.** 1999. Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **181**:3928-3934.
122. **Greenberg, D. B., J. Stülke, et M. H. Saier, Jr.** 2002. Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res. Microbiol.* **153**:519-526.
123. **Grisafi, P. L., A. Scholle, J. Sugiyama, C. Briggs, G. R. Jacobson, et J. W. Lengeler.** 1989. Deletion mutants of the *Escherichia coli* K-12 mannitol permease: dissection of transport-phosphorylation, phospho-exchange, and mannitol-binding activities. *J. Bacteriol.* **171**:2719-2727.
124. **Grossiord, B. P., E. J. Luesink, E. E. Vaughan, A. Arnaud, et W. M. de Vos.** 2003. Characterization, expression, and mutation of the *Lactococcus lactis* galPMKTE genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. *J. Bacteriol.* **185**:870-878.
125. **Gulati, A., et S. Mahadevan.** 2001. The *Escherichia coli* antiterminator protein BglG stabilizes the 5' region of the bgl mRNA. *J. Biosci.* **26**:193-203.
126. **Gunnewijk, M. G., et B. Poolman.** 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.
127. **Gunnewijk, M. G., et B. Poolman.** 2000. Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **275**:34073-34079.
128. **Gunnewijk, M. G., P. W. Postma, et B. Poolman.** 1999. Phosphorylation and functional properties of the IIA domain of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **181**:632-641.
129. **Gunnewijk, M. G., P. T. van den Bogaard, L. M. Veenhoff, E. H. Heuberger, W. M. de Vos, M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, et B. Poolman.** 2001. Hierarchical control *versus* autoregulation of carbohydrate utilization in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:401-413.
130. **Gutknecht, R., R. Beutler, L. F. Garcia-Alles, U. Baumann, et B. Erni.** 2001. The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *EMBO J.* **20**:2480-2486.
131. **Halbedel, S., C. Hames, et J. Stülke.** 2004. *In vivo* activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **186**:7936-7943.
132. **Hamilton, I. R.** 1968. Synthesis and degradation of intracellular polyglucose in *Streptococcus salivarius*. *Can. J. Microbiol.* **14**:65-77.
133. **Han, M. K., S. Roseman, et L. Brand.** 1990. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the sulfhydryl groups and site-specific labeling of enzyme I. *J. Biol. Chem.* **265**:1985-1995.
134. **Hanson, K. G., K. Steinhauer, J. Reizer, W. Hillen, et J. Stülke.** 2002. HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of

- mutations on enzyme activity, growth, and carbon catabolite repression. *Microbiology* **148**:1805-1811.
135. **Harold, F. M., et J. R. Baarda.** 1967. Gramicidin, valinomycin, and cation permeability of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **94**:53-60.
 136. **Harry, J. L., M. R. Wilkins, B. R. Herbert, N. H. Packer, A. A. Gooley, et K. L. Williams.** 2000. Proteomics: capacity *versus* utility. *Electrophoresis* **21**:1071-1081.
 137. **Havlis, J., H. Thomas, M. Sebela, et A. Shevchenko.** 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* **75**:1300-1306.
 138. **Helanto, M., J. Aarnikunnas, A. Palva, M. Leisola, et A. Nyssölä.** 2006. Characterization of genes involved in fructose utilization by *Lactobacillus fermentum*. *Arch. Microbiol.* **186**:51-59.
 139. **Heller, K. B., E. C. Lin, et T. H. Wilson.** 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**:274-278.
 140. **Henderson, P. J., et M. C. Maiden.** 1990. Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326**:391-410.
 141. **Henstra, S. A., R. H. Duurkens, et G. T. Robillard.** 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.
 142. **Henstra, S. A., M. Tuinhof, R. H. Duurkens, et G. T. Robillard.** 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.
 143. **Herzberg, O., P. Reddy, S. Sutrina, M. H. Saier Jr., J. Reizer, et G. Kapadia.** 1992. Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:2499-2503.
 144. **Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:67-113.
 145. **Higgins, C. F., M. P. Gallagher, M. L. Mimmack, et S. R. Pearce.** 1988. A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* **8**:111-116.
 146. **Hirai, T., J. A. Heymann, P. C. Maloney, et S. Subramaniam.** 2003. Structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. *J. Bacteriol.* **185**:1712-1718.
 147. **Hirai, T., J. A. Heymann, D. Shi, R. Sarker, P. C. Maloney, et S. Subramaniam.** 2002. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat. Struct. Biol.* **9**:597-600.
 148. **Holden, M. T., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt, et J. Parkhill.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus*

- aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**:9786-9791.
149. **Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault, et M. Kleerebezem.** 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. FEMS Microbiol. Rev. **29**:435-463.
 150. **Homeyer, N., T. Essigke, G. M. Ullmann, et H. Sticht.** 2007. Effects of histidine protonation and phosphorylation on histidine-containing phosphocarrier protein structure, dynamics, and physicochemical properties. Biochemistry **46**:12314-12326.
 151. **Horstmann, N., G. Seidel, L. M. Aung-Hilbrich, et W. Hillen.** 2007. Residues His-15 and Arg-17 of HPr participate differently in catabolite signal processing via CcpA. J. Biol. Chem. **282**:1175-1182.
 152. **Hoskins, J., W. E. Alborn, Jr., J. Arnold, L. C. Blaszcak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, Jr., P. L. Skatrud, et J. I. Glass.** 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J. Bacteriol. **183**:5709-5717.
 153. **Houman, F., M. R. Diaz-Torres, et A. Wright.** 1990. Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. Cell **62**:1153-1163.
 154. **Hoving, H., J. S. Lolkema, et G. T. Robillard.** 1981. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: equilibrium kinetics and mechanism of enzyme I phosphorylation. Biochemistry **20**:87-93.
 155. **Hu, Y., S. Raengpradub, U. Schwab, C. Loss, R. H. Orsi, M. Wiedmann, et K. J. Boor.** 2007. Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional regulators CtsR and Sigma B in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **73**:7967-7980.
 156. **Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer, et D. N. Wang.** 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. Science **301**:616-620.
 157. **Hubert, J. F., L. Duchesne, C. Delamarche, A. Vaysse, H. Gueuné, et C. Raguénès-Nicol.** 2005. Pore selectivity analysis of an aquaglyceroporin by stopped-flow spectrophotometry on bacterial cell suspensions. Biol. Cell **97**:675-686.
 158. **Hueck, C. J., W. Hillen, et M. H. Saier Jr.** 1994. Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. Res. Microbiol. **145**:503-518.
 159. **Hutkins, R. W., et H. A. Morris.** 1987. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. J. Food Prot. **50**:876-884.
 160. **Hutkins, R. W., et C. Ponne.** 1991. Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a galactose-lactose antiporter. Appl. Environ. Microbiol. **57**:941-944.

161. **Hvorup, R., A. B. Chang, et M. H. Saier Jr.** 2003. Bioinformatic analyses of the bacterial L-ascorbate phosphotransferase system permease family. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**:191-205.
162. **Ibrahim, Y. M., A. R. Kerr, N. A. Silva, et T. J. Mitchell.** 2005. Contribution of the ATP-dependent protease ClpCP to the autolysis and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**:730-740.
163. **Ingram-Smitha, C., S. R. Martina, et K. S. Smith.** 2006. Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends Microbiol.* **14**:249-253.
164. **Jault, J. M., S. Fieulaine, S. Nessler, P. Gonzalo, A. Di Pietro, J. Deutscher, et A. Galinier.** 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.
165. **Jayakumar, A., J. S. Hong, et E. M. Barnes, Jr.** 1987. Feedback inhibition of ammonium (methylammonium) ion transport in *Escherichia coli* by glutamine and glutamine analogs. *J. Bacteriol.* **169**:553-557.
166. **Jia, Z., J. W. Quail, L. T. Delbaere, et E. B. Waygood.** 1994. Structural comparison of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr. *Biochem. Cell Biol.* **72**:202-217.
167. **Jia, Z., M. Vandonselaar, W. Hengstenberg, J. W. Quail, et L. T. Delbaere.** 1994. The 1.6 Å structure of histidine-containing phosphotransfer protein HPr from *Streptococcus faecalis*. *J. Mol. Biol.* **236**:1341-1355.
168. **Jobin, M.-C., et D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**:113-119.
169. **Jones, B. E., V. Dossonnet, E. Küster, W. Hillen, J. Deutscher, et R. E. Klevit.** 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.
170. **Jones, B. E., P. Rajagopal, et R. E. Klevit.** 1997. Phosphorylation on histidine is accompanied by localized structural changes in the phosphocarrier protein, HPr from *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.* **6**:2107-2119.
171. **Jones, M. N., et R. G. Holt.** 2007. Cloning and characterization of an α -enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**:924-929.
172. **Jorgensen, C. M., C. J. Fields, P. Chander, D. Watt, J. W. Burgner 2nd, J. L. Smith, et R. L. Switzer.** 2008. *pyr* RNA binding to the *Bacillus caldolyticus* PyrR attenuation protein - characterization and regulation by uridine and guanosine nucleotides. *FEBS J.* **275**:655-670.
173. **Kalbitzer, H. R., A. Görler, H. Li, P. V. Dubovskii, W. Hengstenberg, C. Kowolik, H. Yamada, et K. Akasaka.** 2000. ^{15}N and ^1H NMR study of histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high pressure. *Protein Sci.* **9**:693-703.
174. **Kalbitzer, H. R., W. Hengstenberg, P. Rösch, P. Muss, P. Bernsmann, R. Engelmann, M. Dörschug, et J. Deutscher.** 1982. HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochemistry* **21**:2879-2885.
175. **Kaplan, H., et R. W. Hutkins.** 2003. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2217-2222.

176. **Kashket, E. R.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* **46**:233-244.
177. **Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, et T. Ezaki.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:406-408.
178. **Kelly, D. J., et G. H. Thomas.** 2001. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:405-424.
179. **Khandelwal, R. L., et I. R. Hamilton.** 1982. Inorganic pyrophosphatase activity in oral streptococci: purification and properties of the enzyme from *Streptococcus salivarius*. *Can. J. Biochem.* **60**:452-462.
180. **Kim, J. H., M. I. Voskuil, et G. H. Chambliss.** 1998. NADP, corepressor for the *Bacillus* catabolite control protein CcpA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:9590-9595.
181. **Kirstein, J., D. Zühlke, U. Gerth, K. Turgay, et M. Hecker.** 2005. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J.* **24**:3435-3445.
182. **Knol, J., L. Veenhoff, W. J. Liang, P. J. Henderson, G. Leblanc, et B. Poolman.** 1996. Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **271**:15358-15366.
183. **Koch, S., S. L. Sutrina, L. F. Wu, J. Reizer, K. Schnetz, B. Rak, et M. H. Saier, Jr.** 1996. Identification of a site in the phosphocarrier protein, HPr, which influences its interactions with sugar permeases of the bacterial phosphotransferase system: kinetic analyses employing site-specific mutants. *J. Bacteriol.* **178**:1126-1133.
184. **Kohlbrecher, D., R. Eisermann, et W. Hengstenberg.** 1992. Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: molecular cloning and nucleotide sequence of the *Staphylococcus carnosus ptsI* gene and expression and complementation studies of the gene product. *J. Bacteriol.* **174**:2208-2214.
185. **Kotrba, P., M. Inui, et H. Yukawa.** 2001. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioengin.* **96**:502-517.
186. **Kravanja, M., R. Engelman, V. Dossonnet, M. Blüggel, H. E. Meyer, R. Frank, A. Galinier, J. Deutscher, N. Schnell, et W. Hengstenberg.** 1999. The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* **31**:59-66.
187. **Kristich, C. J., G. D. Glekas, et G. W. Ordal.** 2003. The conserved cytoplasmic module of the transmembrane chemoreceptor McpC mediates carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **47**:1353-1366.
188. **Krüger, S., S. Gertz, et M. Hecker.** 1996. Transcriptional analysis of *bglPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **178**:2637-2644.
189. **Kukuruzinska, M. A., W. F. Harrington, et S. Roseman.** 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Studies on the molecular weight and association of enzyme I. *J. Biol. Chem.* **257**:14470-14476.

190. **Kundig, W., S. Gosh, et S. Roseman.** 1964. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**:1067-1074.
191. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Düsterhöft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.-Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Hénaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.-F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S.-M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauël, C. Médigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.-H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rosem, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B.-S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, U. S., M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.-F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, et A. Danchin.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
192. **Kuriyama, H., S. Kawamoto, N. Ishida, I. Ohno, S. Mita, Y. Matsuzawa, K. Matsubara, et K. Okubo.** 1997. Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**:53-58.
193. **Lahti, R.** 1983. Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* **47**:169-178.
194. **Lai, X., F. C. Davis, R. B. Hespell, et L. O. Ingram.** 1997. Cloning of cellobiose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase genes: functional expression in recombinant *Escherichia coli* and identification of a putative binding region for disaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:355-363.
195. **Lapointe, R., M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 1993. Altered expression of several genes in III^{Man}_L-defective mutants of *Streptococcus salivarius* demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis of cytoplasmic proteins. *Res. Microbiol.* **144**:305-316.
196. **Leboeuf, C., L. Leblanc, Y. Auffray, et A. Hartke.** 2000. Characterization of the *ccpA* gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by CcpA. *J. Bacteriol.* **182**:5799-5806.

197. **Lee, J. H., H. K. Kang, Y. H. Moon, D. L. Cho, D. Kim, J. Y. Choe, R. Honzatko, et J. F. Robyt.** 2006. Cloning, expression and characterization of an extracellular enolase from *Leuconostoc mesenteroides*. FEMS Microbiol. Lett. **259**:240-248.
198. **Lefevre, J. C., J. P. Claverys, et A. M. Sicard.** 1979. Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. J. Bacteriol. **138**:80-86.
199. **Lemos, J. A., et R. A. Burne.** 2002. Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. **184**:6357-6366.
200. **Lengeler, J. W., K. Jahreis, et U. F. Wehmeier.** 1994. Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. Biochim. Biophys. Acta **1188**:1-28.
201. **Leong-Morgenthaler, P., M. C. Zwahlen, et H. Hottinger.** 1991. Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved. J. Bacteriol. **173**:1951-1957.
202. **Lessard, C., A. Cochu, J.-D. Lemay, D. Roy, K. Vaillancourt, M. Frenette, S. Moineau, et C. Vadeboncoeur.** 2003. Phosphorylation of *Streptococcus salivarius* lactose permease (LacS) by HPr(His~P) and HPr(Ser-P)(His~P) and effects on growth. J. Bacteriol. **185**:6764-6772.
203. **Lewis, M.** 2005. The *lac* repressor. C. R. Biol. **328**:521-548.
204. **LiCalsi, C., T. S. Crocenzi, E. Freire, et S. Roseman.** 1991. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Structural and thermodynamic domains of enzyme I of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. **266**:19519-19527.
205. **Lilley, K. S., A. Razzaq, et P. Dupree.** 2001. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. Curr. Opin. Chem. Biol. **6**:46-50.
206. **Lin, E. C.** 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **30**:535-578.
207. **Lindner, C., A. Galinier, M. Hecker, et J. Deutscher.** 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.
208. **Lindner, C., M. Hecker, D. Le Coq, et J. Deutscher.** 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.
209. **Liong, E. C., et T. Ferenci.** 1994. Molecular cloning of a maltose transport gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. **243**:343-352.
210. **Liu, W. Z., R. Faber, M. Feese, S. J. Remington, et D. W. Pettigrew.** 1994. *Escherichia coli* glycerol kinase: role of a tetramer interface in regulation by fructose 1,6-bisphosphate and phosphotransferase system regulatory protein III^{glc}. Biochemistry **33**:10120-10126.
211. **Locher, K. P., A. T. Lee, et D. C. Rees.** 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. Science **296**:1091-1098.
212. **Lorca, G. L., Y. J. Chung, R. D. Barabote, W. Weyler, C. H. Schilling, et M. H. Saier Jr.** 2005. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. J. Bacteriol. **187**:7826-7839.

213. **Lu, G., J. M. Westbrook, A. L. Davidson, et J. Chen.** 2005. ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:17969-17974.
214. **Lu, Y., et R. L. Switzer.** 1996. Transcriptional attenuation of the *Bacillus subtilis* *pyr* operon by the PyrR regulatory protein and uridine nucleotides *in vitro*. *J. Bacteriol.* **178**:7206-7211.
215. **Ludwig, H., N. Rebhan, H. M. Blencke, M. Merzbacher, et J. Stülke.** 2002. Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol. Microbiol.* **45**:543-553.
216. **Luesink, E. J., R. E. van Herpen, B. P. Grossiord, O. P. Kuipers, et W. M. de Vos.** 1998. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* **30**:789-798.
217. **Mahadevan, S., et A. Wright.** 1987. A bacterial gene involved in transcription antitermination: regulation at a rho-independent terminator in the *bgl* operon of *E. coli*. *Cell* **50**:485-494.
218. **Mahon, P., et P. Dupree.** 2001. Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis* **22**:2075-2085.
219. **Maiden, M. C., E. O. Davis, S. A. Baldwin, D. C. Moore, et P. J. Henderson.** 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**:641-643.
220. **Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J. H. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. H. Saier Jr., T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, et D. Mills.** 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **103**:15611-15616.
221. **Marouga, R., S. David, et E. Hawkins.** 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**:669-678.
222. **Márquez, J. A., S. Hasenbein, B. Koch, S. Fieulaine, S. Nessler, R. B. Russell, W. Hengstenberg, et K. Scheffzek.** 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. U.S.A.* **99**:3458-3463.
223. **Martin-Verstraete, I., V. Charrier, J. Stülke, A. Galinier, B. Erni, G. Rapoport, et J. Deutscher.** 1998. Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol. Microbiol.* **28**:293-303.
224. **Martin-Verstraete, I., M. Débarbouillé, A. Klier, et G. Rapoport.** 1994. Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J. Mol. Biol.* **241**:178-192.

225. **Martin-Verstraete, I., A. Galinier, E. Darbon, Y. Quentin, M. C. Kilhoffer, V. Charrier, J. Haiech, G. Rapoport, et J. Deutscher.** 1999. The Q15H mutation enables Crh, a *Bacillus subtilis* HPr-like protein, to carry out some regulatory HPr functions, but does not make it an effective phosphocarrier for sugar transport. *Microbiology* **145**:3195-3204.
226. **Martin, S. A., et J. B. Russell.** 1987. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2388-2393.
227. **Martinussen, J., et K. Hammer.** 1998. The *carB* gene encoding the large subunit of carbamoylphosphate synthetase from *Lactococcus lactis* is transcribed monocistronically. *J. Bacteriol.* **180**:4380-4386.
228. **Mattoo, R. L., et E. B. Waygood.** 1983. An enzymatic method for [³²P]phosphoenolpyruvate synthesis. *Anal. Biochem.* **128**:245-249.
229. **Maurel, C.** 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:399-429.
230. **Maurel, C., J. Reizer, J. I. Schroeder, et M. J. Chrispeels.** 1993. The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **12**:2241-2247.
231. **Maurel, C., J. Reizer, J. I. Schroeder, M. J. Chrispeels, et M. H. Saier Jr.** 1994. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**:11869-11872.
232. **Maurer, T., R. Döker, A. Görler, W. Hengstenberg, et H. R. Kalbitzer.** 2001. Three-dimensional structure of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) from *Enterococcus faecalis* in solution. *Eur. J. Biochem.* **268**:635-644.
233. **Maurer, T., S. Meier, N. Kachel, C. E. Munte, S. Hasenbein, B. Koch, W. Hengstenberg, et H. R. Kalbitzer.** 2004. High-resolution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* and characterization of its interaction with the bifunctional HPr kinase/phosphorylase. *J. Bacteriol.* **186**:5906-5918.
234. **Mazé, A., G. Boël, S. Poncet, I. Mijakovic, Y. Le Breton, A. Benachour, V. Monedero, J. Deutscher, et A. Hartke.** 2004. The *Lactobacillus casei ptsHI47T* mutation causes overexpression of a LevR-regulated but RpoN-independent operon encoding a mannose class phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **186**:4543-4555.
235. **McLaughlin, R. E., et J. J. Ferretti.** 1996. The multiple-sugar metabolism (*msm*) gene cluster of *Streptococcus mutans* is transcribed as a single operon. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**:261-264.
236. **Meadow, N. D., D. K. Fox, et S. Roseman.** 1990. The bacterial phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:497-542.
237. **Meinken, C., H. M. Blencke, H. Ludwig, et J. Stülke.** 2003. Expression of the glycolytic *gapA* operon in *Bacillus subtilis*: differential syntheses of proteins encoded by the operon. *Microbiology* **149**:751-761.
238. **Mélançon, D., et D. Grenier.** 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4482-4488.
239. **Melin, P., C. Norez, I. Callebaut, et F. Becq.** 2005. The glycine residues G551 and G1349 within the ATP-binding cassette signature motifs play critical roles in

- the activation and inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by phloxine B. *J. Membr. Biol.* **208**:203-212.
240. **Mijakovic, I., S. Poncet, A. Galinier, V. Monedera, S. Fieulaine, J. Janin, S. Nessler, J. A. Márquez, K. Scheffzek, S. Hasenbein, W. Hengstenberg, et J. Deutscher.** 2002. Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:13442-13447.
 241. **Minden, J.** 2007. Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques* **43**:739, 741, 743, 745.
 242. **Misset, O., M. Brouwer, et G. T. Robillard.** 1980. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of enzyme I. *Biochemistry* **19**:883-890.
 243. **Miwa, Y., A. Nakata, A. Ogiwara, M. Yamamoto, et Y. Fujita.** 2000. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**:1206-1210.
 244. **Möglich, A., B. Koch, W. Gronwald, W. Hengstenberg, E. Brunner, et H. R. Kalbitzer.** 2004. Solution structure of the active-centre mutant I14A of the histidine-containing phosphocarrier protein from *Staphylococcus carnosus*. *Eur. J. Biochem.* **271**:4815-4824.
 245. **Monedero, V., O. P. Kuipers, E. Jamet, et J. Deutscher.** 2001. Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **183**:3391-3398.
 246. **Monedero, V., A. Mazé, G. Boël, M. Zúñiga, S. Beaufiles, A. Hartke, et J. Deutscher.** 2007. The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**:20-32.
 247. **Monedero, V., S. Poncet, I. Mijakovic, S. Fieulaine, V. Dossonnet, I. Martin-Verstraete, S. Nessler, et J. Deutscher.** 2001. Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J.* **20**:3928-3937.
 248. **Monedero, V., M. J. Yebra, S. Poncet, et J. Deutscher.** 2008. Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. *Res. Microbiol.* **159**:94-102.
 249. **Morbach, S., S. Tebbe, et E. Schneider.** 1993. The ATP-binding cassette (ABC) transporter for maltose/maltodextrins of *Salmonella typhimurium*. Characterization of the ATPase activity associated with the purified MalK subunit. *J. Biol. Chem.* **268**:18617-18621.
 250. **Moreno, M. S., B. L. Schneider, R. R. Maile, W. Weyler, et M. H. Saier Jr.** 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* **39**:1366-1381.
 251. **Mortz, E., T. N. Krogh, H. Vorum, et A. Görg.** 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**:1359-1363.
 252. **Müller, W., N. Horstmann, W. Hillen, et H. Sticht.** 2006. The transcription regulator RbsR represents a novel interaction partner of the phosphoprotein HPr-Ser46-P in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **273**:1251-1261.

253. **Napper, S., J. W. Anderson, F. Georges, J. W. Quail, L. T. Delbaere, et E. B. Waygood.** 1996. Mutation of serine-46 to aspartate in the histidine-containing protein of *Escherichia coli* mimics the inactivation by phosphorylation of serine-46 in HPrs from gram-positive bacteria. *Biochemistry* **35**:11260-11267.
254. **Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev, et M. V. Ivanov.** 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:433-446.
255. **Neidhart, F. C., J. L. Ingraham, et M. Schaechter.** 1994. Composition et organisation de la cellule bactérienne., p. 1-27, *Physiologie de la cellule bactérienne. Une approche moléculaire.* Masson, Paris.
256. **Neves, A. R., W. A. Pool, J. Kok, O. P. Kuipers, et H. Santos.** 2005. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from *in vivo* NMR. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:531-554.
257. **Nieto, C., M. Espinosa, et A. Puyet.** 1997. The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *J. Biol. Chem.* **272**:30860-30865.
258. **Nilsson, G., J. G. Belasco, S. N. Cohen, et A. von Gabain.** 1984. Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**:75-77.
259. **Nosworthy, N. J., A. Peterkofsky, S. König, Y. J. Seok, R. H. Szczepanowski, et A. Ginsburg.** 1998. Phosphorylation destabilizes the amino-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **37**:6718-6726.
260. **Nussbaum-Shochat, A., et O. Amster-Choder.** 1999. BglG, the transcriptional antiterminator of the *bgl* system, interacts with the beta' subunit of the *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:4336-4341.
261. **Oliveira, A. P., J. Nielsen, et J. Förster.** 2005. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol.* **5**:39.
262. **Pancholi, V., et V. A. Fischetti.** 1998. α -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic *streptococci*. *J. Biol. Chem.* **273**:14503-14515.
263. **Pao, S. S., I. T. Paulsen, et M. H. Saier, Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1-34.
264. **Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, et C. M. Fraser.** 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071-2074.

265. **Paulsen, I. T., S. Chauvaux, P. Choi, et M. H. Saier Jr.** 1998. Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J. Bacteriol.* **180**:498-504.
266. **Paulsen, I. T., L. Nguyen, M. K. Sliwinski, R. Rabus, et M. H. Saier Jr.** 2000. Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* **301**:75-100.
267. **Paulsen, I. T., J. Reizer, R. Z. Jin, E. C. Lin, et M. H. Saier Jr.** 2000. Functional genomic studies of dihydroxyacetone utilization in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**:2343-2344.
268. **Pelletier, M., M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 1995. Distribution of proteins similar to III^{Man_H} and III^{Man_L} of the *Streptococcus salivarius* phosphoenolpyruvate:mannose-glucose phosphotransferase system among oral and nonoral bacteria. *J. Bacteriol.* **177**:2270-2275.
269. **Pelletier, M., L. A. Lortie, M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 1998. The phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*. Functional and biochemical characterization of IIAB_L^{Man} and IIAB_H^{Man}. *Biochemistry* **37**:1604-1612.
270. **Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, et J. S. Cottrell.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**:3551-3567.
271. **Plamondon, P., D. Brochu, S. Thomas, J. Fradette, L. Gauthier, K. Vaillancourt, N. Buckley, M. Frenette, et C. Vadeboncoeur.** 1999. Phenotypic consequences resulting from a methionine-to-valine substitution at position 48 in the HPr protein of *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* **181**:6914-6921.
272. **Pompeo, F., Y. Granet, J. P. Lavergne, C. Grangeasse, S. Nessler, J. M. Jault, et A. Galinier.** 2003. Regulation and mutational analysis of the HPr kinase/phosphorylase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **42**:6762-6771.
273. **Pompeo, F., J. Luciano, et A. Galinier.** 2007. Interaction of GapA with HPr and its homologue, Crh: Novel levels of regulation of a key step of glycolysis in *Bacillus subtilis*? *J. Bacteriol.* **189**:1154-1157.
274. **Poncet, S., I. Mijakovic, S. Nessler, V. Gueguen-Chaignon, V. Chaptal, A. Galinier, G. Boël, A. Mazé, et J. Deutscher.** 2004. HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1697**:123-135.
275. **Poolman, B., J. Knol, B. Mollet, B. Nieuwenhuis, et G. Sulter.** 1995. Regulation of bacterial sugar-H⁺ symport by phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I/HPr-mediated phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:778-782.
276. **Poolman, B., J. Knol, C. van der Does, P. J. Henderson, W. J. Liang, G. Leblanc, T. Pourcher, et I. Mus-Veteau.** 1996. Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Mol. Microbiol.* **19**:911-922.
277. **Poolman, B., T. J. Royer, S. E. Mainzer, et B. F. Schmidt.** 1989. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* **171**:244-253.
278. **Postma, P. W., J. W. Lengeler, et G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:543-594.

279. **Prasad, J., P. McJarrow, et P. Gopal.** 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:917-925.
280. **Presecan-Siedel, E., A. Galinier, R. Longin, J. Deutscher, A. Danchin, P. Glaser, et I. Martin-Verstraete.** 1999. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:6889-6897.
281. **Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, et P. Agre.** 1992. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**:385-387.
282. **Pujic, P., R. Dervyn, A. Sorokin, et S. D. Ehrlich.** 1998. The *kdgRKAT* operon of *Bacillus subtilis*: detection of the transcript and regulation by the *kdgR* and *ccpA* genes. *Microbiology* **144**:3111-3118.
283. **Quivey Jr., R. G., W. L. Kuhnert, et K. Hahn.** 2000. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv. Microb. Physiol.* **42**:239-274.
284. **Reid, S. J., et V. R. Abratt.** 2005. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:312-321.
285. **Reizer, A., J. Deutscher, M. H. Saier Jr., et J. Reizer.** 1991. Analysis of the gluconate (*gnt*) operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **5**:1081-1089.
286. **Reizer, J., S. Deutscher, S. Sutrina, S. Thompson, et M. H. Saier Jr.** 1985. Sugar accumulation in Gram-positive bacteria: exclusion and expulsion mechanisms. *TIBS* **10**:32-35.
287. **Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivolta, R. Rabus, J. Stülke, D. Karamata, M. H. Saier Jr., et W. Hillen.** 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* **27**:1157-1169.
288. **Reizer, J., W. J. Mitchell, N. Minton, J. Brehm, A. Reizer, et M. H. Saier Jr.** 1996. Proposed topology of the glucitol permeases of *Escherichia coli* and *Clostridium acetobutylicum*. *Curr. Microbiol.* **33**:331-333.
289. **Reizer, J., M. J. Novotny, W. Hengstenberg, et M. H. Saier Jr.** 1984. Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a seryl residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **160**:333-340.
290. **Reizer, J., M. J. Novotny, I. Stuiver, et M. H. Saier Jr.** 1984. Regulation of glycerol uptake by the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **159**:243-250.
291. **Reizer, J., A. Reizer, M. J. Lagrou, K. R. Folger, C. K. Stover, et M. H. Saier Jr.** 1999. Novel phosphotransferase systems revealed by bacterial genome analysis: the complete repertoire of *pts* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:289-293.
292. **Reizer, J., S. L. Sutrina, M. H. Saier Jr., G. C. Stewart, A. Peterkofsky, et P. Reddy.** 1989. Mechanistic and physiological consequences of HPr(Ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J.* **8**:2111-2120.
293. **Reizer, J., S. L. Sutrina, L. F. Wu, J. Deutscher, P. Reddy, et M. H. Saier Jr.** 1992. Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:9158-9169.

294. **Richert, S., S. Luche, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, et T. Rabilloud.** 2004. About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* **4**:909-916.
295. **Rius, N., et J. G. Lorén.** 1998. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of neutrophilic and alkalophilic gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1344-1349.
296. **Rius, N., M. Solé, A. Francia, et J. G. Lorén.** 1994. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**:291-295.
297. **Robillard, G. T., et J. Broos.** 1999. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1422**:73-104.
298. **Robitaille, D., L. Gauthier, et C. Vadeboncoeur.** 1991. The presence of two forms of the phosphocarrier protein HPr of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in streptococci. *Biochimie* **73**:573-581.
299. **Rodwell, A. W., et A. Mitchell.** 1979. Nutrition, growth and reproduction., p. 103-139. *Dans* M. F. Barile and S. Razin, *The Mycoplasmas*, vol. 1. V. I. Academic Press, New York.
300. **Romano, A. H., M. H. Saier Jr., O. T. Harriott, et J. Reizer.** 1990. Physiological studies on regulation of glycerol utilization by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **172**:6741-6748.
301. **Rubin, R. A., S. B. Levy, R. L. Henrikson, et F. J. Kézdy.** 1990. Gene duplication in the evolution of the two complementing domains of gram-negative bacterial tetracycline efflux proteins. *Gene* **87**:7-13.
302. **Russell, R. R., J. Aduse-Opoku, I. C. Sutcliffe, L. Tao, et J. J. Ferretti.** 1992. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**:4631-4637.
303. **Rutberg, B.** 1997. Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol. Microbiol.* **23**:413-421.
304. **Saier Jr., M. H.** 1977. Bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships. *Bacteriol. Rev.* **41**:856-871.
305. **Saier Jr., M. H.** 1999. Eukaryotic transmembrane solute transport systems. *Int. Rev. Cytol.* **190**:61-136.
306. **Saier Jr., M. H.** 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* **35**:699-710.
307. **Saier Jr., M. H.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:354-411.
308. **Saier Jr., M. H.** 1989. Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* **53**:109-120.
309. **Saier Jr., M. H., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jähn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, et P. S. Virk.** 1999. The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:257-279.

310. **Saier Jr., M. H., S. Chauvaux, G. M. Cook, J. Deutscher, I. T. Paulsen, J. Reizer, et J. J. Ye.** 1996. Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **142**:217-230.
311. **Saier Jr., M. H., S. Chauvaux, J. Deutscher, J. Reizer, et J. J. Ye.** 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **20**:267-271.
312. **Saier Jr., M. H., R. N. Hvorup, et R. D. Barabote.** 2005. Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:220-224.
313. **Saier Jr., M. H., et J. Reizer.** 1994. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol. Microbiol.* **13**:755-764.
314. **Saier Jr., M. H., et J. Reizer.** 1992. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **174**:1433-1438.
315. **Saier Jr., M. H., et S. Roseman.** 1976. Sugar transport. Inducer exclusion and regulation of the melibiose, maltose, glycerol, and lactose transport systems by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **251**:6606-6615.
316. **Saier Jr., M. H., M. R. Schmidt, et P. Lin.** 1980. Phosphoryl exchange reaction catalyzed by enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Kinetic characterization. *J. Biol. Chem.* **255**:8579-8584.
317. **Saier Jr., M. H., C. V. Tran, et R. D. Barabote.** 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* **34**:D181-186.
318. **Saier Jr., M. H., M. Yamada, B. Erni, K. Suda, J. Lengeler, R. Ebner, P. Argos, B. Rak, K. Schnetz, C. A. Lee, G. C. Stewart, F. Breidt, E. B. Waygood, K. G. Peri, et R. F. Doolittle.** 1988. Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *FASEB J.* **2**:199-208.
319. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, et T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (N.Y.).
320. **Saraceni-Richards, C. A., et G. R. Jacobson.** 1997. A conserved glutamate residue, Glu-257, is important for substrate binding and transport by the *Escherichia coli* mannitol permease. *J. Bacteriol.* **179**:1135-1142.
321. **Saurin, W., M. Hofnung, et E. Dassa.** 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48**:22-41.
322. **Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M. C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore, et F. Arigoni.** 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:14422-14427.
323. **Schmalisch, M. H., S. Bachem, et J. Stülke.** 2003. Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein GlcT by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of GlcT. *J. Biol. Chem.* **278**:51108-51115.
324. **Schnetz, K., C. Toloczyki, et B. Rak.** 1987. Beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible

- evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. J. Bacteriol. **169**:2579-2590.
325. **Sektas, M., et W. Szybalsky.** 2002. Novel single-copy pETcoco™ vector with dual controls for amplification and expression. in *Novations* **14**:6-8.
326. **Seok, Y. J., B. R. Lee, P. P. Zhu, et A. Peterkofsky.** 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. U.S.A. **93**:347-351.
327. **Shelburne 3rd, S. A., H. Fang, N. Okorafor, P. Sumby, I. Sitkiewicz, D. Keith, P. Patel, C. Austin, E. A. Graviss, J. M. Musser, et D. C. Chow.** 2007. MalE of group A *Streptococcus* participates in the rapid transport of maltotriose and longer maltodextrins. J. Bacteriol. **189**:2610-2617.
328. **Shelburne 3rd, S. A., P. Sumby, I. Sitkiewicz, N. Okorafor, C. Granville, P. Patel, J. Voyich, R. Hull, F. R. DeLeo, et J. M. Musser.** 2006. Maltodextrin utilization plays a key role in the ability of group A *Streptococcus* to colonize the oropharynx. Infect. Immun. **74**:4605-4614.
329. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, et M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. **68**:850-858.
330. **Shimabuku, A. M., T. Nishimoto, K. Ueda, et T. Komano.** 1992. P-glycoprotein. ATP hydrolysis by the N-terminal nucleotide-binding domain. J. Biol. Chem. **267**:4308-4011.
331. **Shin, B. S., S. K. Choi, et S. H. Park.** 1999. Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. J. Biochem. **126**:333-339.
332. **Siebold, C., I. Arnold, L. F. Garcia-Alles, U. Baumann, et B. Erni.** 2003. Crystal structure of the *Citrobacter freundii* dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded alpha-helical barrel ATP-binding domain. J. Biol. Chem. **278**:48236-48244.
333. **Spooner, P. J., R. H. Friesen, J. Knol, B. Poolman, et A. Watts.** 2000. Rotational mobility and orientational stability of a transport protein in lipid membranes. Biophys. J. **79**:756-766.
334. **Spooner, P. J., L. M. Veenhoff, A. Watts, et B. Poolman.** 1999. Structural information on a membrane transport protein from nuclear magnetic resonance spectroscopy using sequence-selective nitroxide labeling. Biochemistry **38**:9634-9639.
335. **Stentz, R., et M. Zagorec.** 1999. Ribose utilization in *Lactobacillus sakei*: analysis of the regulation of the *rhs* operon and putative involvement of a new transporter. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **1**:165-173.
336. **Stiles, M. E., et W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. **36**:1-29.
337. **Stülke, J., M. Arnaud, G. Rapoport, et I. Martin-Verstraete.** 1998. PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. Mol. Microbiol. **28**:865-874.
338. **Stülke, J., et W. Hillen.** 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annu. Rev. Microbiol. **54**:849-880.
339. **Stülke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier, et G. Rapoport.** 1997. Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. Mol. Microbiol. **25**:65-78.

340. Sweet, G., C. Gandor, R. Voegelé, N. Wittekindt, J. Beuerle, V. Truniger, E. C. Lin, et W. Boos. 1990. Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of *glpF* and identification of the *glpF* product. *J. Bacteriol.* **172**:424-430.
341. Switzer, R. L., R. J. Turner, et Y. Lu. 1999. Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon by transcriptional attenuation: control of gene expression by an mRNA-binding protein. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**:329-367.
342. Takata, K., T. Matsuzaki, et Y. Tajika. 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog. Histochem. Cytochem.* **39**:1-83.
343. Takeuchi, F., S. Watanabe, T. Baba, H. Yuzawa, T. Ito, Y. Morimoto, M. Kuroda, L. Cui, M. Takahashi, A. Ankai, S. Baba, S. Fukui, J. C. Lee, et K. Hiramatsu. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J. Bacteriol.* **187**:7292-7308.
344. Tamura, G. S., A. Nittayajarn, et D. L. Schoentag. 2002. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect. Immun.* **70**:2877-2885.
345. Tamura, G. S., et C. E. Rubens. 1995. Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol. Microbiol.* **15**:581-589.
346. Tang, D. J., Y. Q. He, J. X. Feng, B. R. He, B. L. Jiang, G. T. Lu, B. Chen, et J. L. Tang. 2005. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J. Bacteriol.* **187**:6231-6237.
347. Tanghe, A., P. Van Dijck, et J. M. Thevelein. 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol.* **14**:78-85.
348. Tangney, M., J. K. Brehm, N. P. Minton, et W. J. Mitchell. 1998. A gene system for glucitol transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1612-1619.
349. Tangney, M., et W. J. Mitchell. 2000. Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:71-80.
350. Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, et C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:12391-12396.
351. Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, et C. M. Fraser.

2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**:498-506.
352. **Thiagalingam, S., et L. Grossman.** 1993. The multiple roles for ATP in the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease-catalyzed incision reaction. *J. Biol. Chem.* **268**:18382-18389.
353. **Thibault, L., et C. Vadeboncoeur.** 1985. Phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase transport system of *Streptococcus mutans*: purification of HPr and enzyme I and determination of their intracellular concentrations by rocket immunoelectrophoresis. *Infect. Immun.* **50**:817-825.
354. **Thomas, S., D. Brochu, et C. Vadeboncoeur.** 2001. Diversity of *Streptococcus salivarius ptsH* mutants that can be isolated in the presence of 2-deoxyglucose and galactose and characterization of two mutants synthesizing reduced levels of HPr, a phosphocarrier of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **183**:5145-5154.
355. **Thompson, J., et B. M. Chassy.** 1985. Intracellular phosphorylation of glucose analogs via the phosphoenolpyruvate:mannose-phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **162**:224-234.
356. **Thompson, J., et D. A. Torchia.** 1984. Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **158**:791-800.
357. **Titgemeyer, F., et W. Hillen.** 2002. Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:59-71.
358. **Tobisch, S., D. Zühlke, J. Bernhardt, J. Stülke, et M. Hecker.** 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:6996-7004.
359. **Tojo, S., T. Satomura, K. Morisaki, J. Deutscher, K. Hirooka, et Y. Fujita.** 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol.* **56**:1560-1573.
360. **Tortosa, P., S. Aymerich, C. Lindner, M. H. Saier Jr., J. Reizer, et D. Le Coq.** 1997. Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **272**:17230-17237.
361. **Tortosa, P., N. Declerck, H. Dutartre, C. Lindner, J. Deutscher, et D. Le Coq.** 2001. Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol. Microbiol.* **41**:1381-1393.
362. **Towbin, H., T. Staehelin, et J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:4350-4354.
363. **Tsakaguchi, H., C. Shayakul, U. V. Berger, B. Mackenzie, S. Devidas, W. B. Guggino, A. N. van Hoek, et M. A. Hediger.** 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**:24737-24743.
364. **Turinsky, A. J., F. J. Grundy, J. H. Kim, G. H. Chambliss, et T. M. Henkin.** 1998. Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J. Bacteriol.* **180**:5961-5967.
365. **Turk, E., O. Kim, J. le Coutre, J. P. Whitelegge, S. Eskandari, J. T. Lam, M. Kreman, G. Zampighi, K. F. Faull, et E. M. Wright.** 2000. Molecular

- characterization of *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT: a model for sodium-coupled sugar cotransporters. *J. Biol. Chem.* **275**:25711-25716.
366. **Turner, R. J., Y. Lu, et R. L. Switzer.** 1994. Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **176**:3708-3722.
367. **Ursitti, J. A., J. Mozdzanowski, et D. W. Speicher.** 1995. Electroblothing from polyacrylamide gels, p. 10.7.1-10.7.14. *Dans* J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, et P. T. Wingfield, *Current protocols in protein science.*, vol. 2. John Wiley and Sons, inc., USA.
368. **Vadeboncoeur, C.** 1984. Structure and properties of the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system of oral streptococci. *Can. J. Microbiol.* **30**:495-502.
369. **Vadeboncoeur, C., D. Brochu, et J. Reizer.** 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.
370. **Vadeboncoeur, C., M. Frenette, et L. A. Lortie.** 2000. Regulation of the *pts* operon in low G+C Gram-positive bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:483-490.
371. **Vadeboncoeur, C., et L. Gauthier.** 1987. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*. Identification of a III^{man} protein. *Can. J. Microbiol.* **33**:118-122.
372. **Vadeboncoeur, C., et M. Pelletier.** 1997. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**:187-207.
373. **Vadeboncoeur, C., M. Proulx, et L. Trahan.** 1983. Purification of proteins similar to HPr and enzyme I from the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. Biochemical and immunochemical properties. *Can. J. Microbiol.* **29**:1694-1705.
374. **Vaillancourt, K., S. Moineau, M. Frenette, C. Lessard, et C. Vadeboncoeur.** 2002. Galactose and lactose genes from the galactose-positive bacterium *Streptococcus salivarius* and the phylogenetically related galactose-negative bacterium *Streptococcus thermophilus*: organization, sequence, transcription, and activity of the *gal* gene products. *J. Bacteriol.* **184**:785-793.
375. **van de Guchte, M., S. Penaud, C. Grimaldi, V. Barbe, K. Bryson, P. Nicolas, C. Robert, S. Oztas, S. Mangenot, A. Couloux, V. Loux, R. Dervyn, R. Bossy, A. Bolotin, J. M. Batto, T. Walunas, J. F. Gibrat, P. Bessières, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, et E. Maguin.** 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:9274-9279.
376. **van den Bogaard, P. T., P. Hols, O. P. Kuipers, M. Kleerebezem, et W. M. de Vos.** 2004. Sugar utilisation and conservation of the *gal-lac* gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:10-17.
377. **van der Vlag, J., K. van Dam, et P. W. Postma.** 1994. Quantification of the regulation of glycerol and maltose metabolism by IIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate-dependent glucose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:3518-3526.

378. **van Nuland, N. A., R. Boelens, R. M. Scheek, et G. T. Robillard.** 1995. High-resolution structure of the phosphorylated form of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Escherichia coli* determined by restrained molecular dynamics from NMR-NOE data. *J. Mol. Biol.* **246**:180-193.
379. **van Nuland, N. A., I. W. Hangyi, R. C. van Schaik, H. J. Berendsen, W. F. van Gunsteren, R. M. Scheek, et G. T. Robillard.** 1994. The high-resolution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Escherichia coli* determined by restrained molecular dynamics from nuclear magnetic resonance nuclear Overhauser effect data. *J. Mol. Biol.* **237**:544-559.
380. **van Tilbeurgh, H., et N. Declerck.** 2001. Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:685-693.
381. **van Tilbeurgh, H., D. Le Coq, et N. Declerck.** 2001. Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator. *EMBO J.* **20**:3789-3799.
382. **van Tilbeurgh, H., X. Manival, S. Aymerich, J. M. Lhoste, C. Dumas, et M. Kochoyan.** 1997. Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **16**:5030-5036.
383. **Vaughan, E. E., S. David, et W. M. de Vos.** 1996. The lactose transporter in *Leuconostoc lactis* is a new member of the LacS subfamily of galactoside-pentose-hexuronide translocators. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1574-1582.
384. **Veenhoff, L. M., E. H. Heuberger, et B. Poolman.** 2001. The lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways. *EMBO J.* **20**:3056-3062.
385. **Veenhoff, L. M., et B. Poolman.** 1999. Substrate recognition at the cytoplasmic and extracellular binding site of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **274**:33244-33250.
386. **Viana, R., V. Monedero, V. Dossonnet, C. Vadeboncoeur, G. Pérez-Martínez, et J. Deutscher.** 2000. Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol. Microbiol.* **36**:570-584.
387. **Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, et N. J. Gay.** 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951.
388. **Wang, G., M. Sondej, D. S. Garrett, A. Peterkofsky, et G. M. Clore.** 2000. A common interface on histidine-containing phosphocarrier protein for interaction with its partner proteins. *J. Biol. Chem.* **275**:16401-16403.
389. **Warner, J. B., et J. S. Lolkema.** 2003. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:475-490.
390. **Waygood, E. B.** 1986. Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system has two sites of phosphorylation per dimer. *Biochemistry* **25**:4085-4090.
391. **Waygood, E. B., E. Erickson, O. A. el Kabbani, et L. T. Delbaere.** 1985. Characterization of phosphorylated histidine-containing protein (HPr) of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **24**:6938-6945.

392. **Waygood, E. B., N. D. Meadow, et S. Roseman.** 1979. Modified assay procedures for the phosphotransferase system in enteric bacteria. *Anal. Biochem.* **95**:293-304.
393. **Waygood, E. B., K. Pasloske, L. T. Delbaere, J. Deutscher, et W. Hengstenberg.** 1988. Characterization of the 1-phosphohistidiny residue in the phosphocarrier protein HPr of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Streptococcus faecalis*. *Biochem. Cell Biol.* **66**:76-80.
394. **Waygood, E. B., et T. Steeves.** 1980. Enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. Purification to homogeneity and some properties. *Can. J. Biochem.* **58**:40-48.
395. **Weaver, C. A., Y. Y. Chen, et R. A. Burne.** 2000. Inactivation of the *ptsI* gene encoding enzyme I of the sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*: effects on growth and urease expression. *Microbiology* **146**:1179-1185.
396. **Webb, A. J., K. A. Homer, et A. H. Hosie.** 2007. A phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system is the principal maltose transporter in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **189**:3322-3327.
397. **Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. van Sinderen, et J. Kok.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* **189**:3256-3270.
398. **Weigel, N., M. A. Kukuruzinska, A. Nakazawa, E. B. Waygood, et S. Roseman.** 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalysed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **257**:14477-14491.
399. **Weigel, N., E. B. Waygood, M. A. Kukuruzinska, A. Nakazawa, et S. Roseman.** 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Isolation and characterization of enzyme I from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **257**:14461-14469.
400. **Weiss, D. S., J. Batut, K. E. Klose, J. Keener, et S. Kustu.** 1991. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**:155-167.
401. **West, I. C.** 1997. Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1331**:213-234.
402. **Williams Jr., D. C., M. Cai, J. Y. Suh, A. Peterkofsky, et G. M. Clore.** 2005. Solution NMR structure of the 48-kDa IIA^{Mannose}-HPr complex of the *Escherichia coli* mannose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* **280**:20775-20784.
403. **Wittekind, M., J. Reizer, J. Deutscher, M. H. Saier Jr., et R. E. Klevit.** 1989. Common structural changes accompany the functional inactivation of HPr by seryl phosphorylation or by serine to aspartate substitution. *Biochemistry* **28**:9908-9912.
404. **Wouters, J., H. Kamphuis, J. Hugenholtz, O. Kuipers, V. W. De Vos, et T. Abee.** 2000. Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3686-3691.
405. **Wu, L.-F., J. M. Tomich, et M. H. Saier Jr.** 1990. Structure and evolution of a multidomain multiphosphoryl transfer protein. Nucleotide sequence of the *fruB(HI)* gene in *Rhodobacter capsulatus* and comparisons with homologous genes from other organisms. *J. Mol. Biol.* **213**:687-703.

406. **Würsch, P., et B. Koellreutter.** 1985. Maltotriitol inhibition of maltose metabolism in *Streptococcus mutans* via maltose transport, amylomaltase and phospho-alpha-glucosidase activities. *Caries Res.* **19**:439-449.
407. **Xiao, Z., et P. Xu.** 2007. Acetoin metabolism in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **33**:127-140.
408. **Yamada, M., et M. H. Saier Jr.** 1987. Glucitol-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *gut* operon. *J. Biol. Chem.* **262**:5455-5463.
409. **Ye, J. J., J. Minarcik, et M. H. Saier Jr.** 1996. Inducer expulsion and the occurrence of an HPr(Ser-P)-activated sugar-phosphate phosphatase in *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* **142**:585-592.
410. **Ye, J. J., J. Reizer, X. Cui, et M. H. Saier Jr.** 1994. ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in the phosphocarrier protein HPr regulates lactose/H⁺ symport in *Lactobacillus brevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:3102-3106.
411. **Ye, J. J., J. Reizer, et M. H. Saier Jr.** 1994. Regulation of 2-deoxyglucose phosphate accumulation in *Lactococcus lactis* vesicles by metabolite-activated, ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in HPr of the phosphotransferase system. *Microbiology* **140**:3421-3429.
412. **Ye, J. J., et M. H. Saier Jr.** 1995. Allosteric regulation of the glucose:H⁺ symporter of *Lactobacillus brevis*: cooperative binding of glucose and HPr(ser-P). *J. Bacteriol.* **177**:1900-1902.
413. **Ye, J. J., et M. H. Saier 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. U.S.A.* **92**:417-421.
414. **Zaliecckas, J. M., L. V. Wray Jr., et S. H. Fisher.** 1998. Expression of the *Bacillus subtilis acaA* gene: position and sequence context affect *cre*-mediated carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**:6649-6654.
415. **Zhu, P. P., J. Reizer, A. Reizer, et A. Peterkofsky.** 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.
416. **Zhu, P. P., R. H. Szczepanowski, N. J. Nosworthy, A. Ginsburg, et A. Peterkofsky.** 1999. Reconstitution studies using the helical and carboxy-terminal domains of enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **38**:15470-15479.
417. **Zúñiga, M., I. Comas, R. Linaje, V. Monedero, M. J. Yebra, C. D. Esteban, J. Deutscher, G. Pérez-Martínez, et F. González-Candelas.** 2005. Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters. *Mol. Biol. Evol.* **22**:1673-1685.

